MIKROCHEMIE

INTERNATIONALES ARCHIV FÜR DEREN GESAMTGEBIET

FESTSCHRIFT

zum 60. Geburtstag

von

HOFRAT PROF. DR. FRITZ PREGL

EMIL HAIM & CO.
WIEN UND LEIPZIG
1929

Der Name bürgt für Qualität

ANALYSEN-
CHEMIKALIEN
REAGENZIEN
von höchster Reinheit und größter Zuverlässigkeit

Reagenzien zur mikroanalytischen Untersuchung von Körperflüssigkeiten nach Ivar - Bang
Indikatoren, Farbstoffe, Farbstoffkombinationen und andere Hilfsmittel für die Microscopie.

Zu beziehen durch den pharmazeutischen Großhandel

E. Merck, Darmstadt
Chemische Fabrik

Vertreter für Österreich:
Franz Fasching, Wien IX, Boltzmanngasse 1

MIKROCHEMIE

INTERNATIONALES ARCHIV FÜR DEREN GESAMTGEBIET

FESTSCHRIFT

zum 60. Geburtstag

von

HOFRAT PROF. DR. FRITZ PREGL

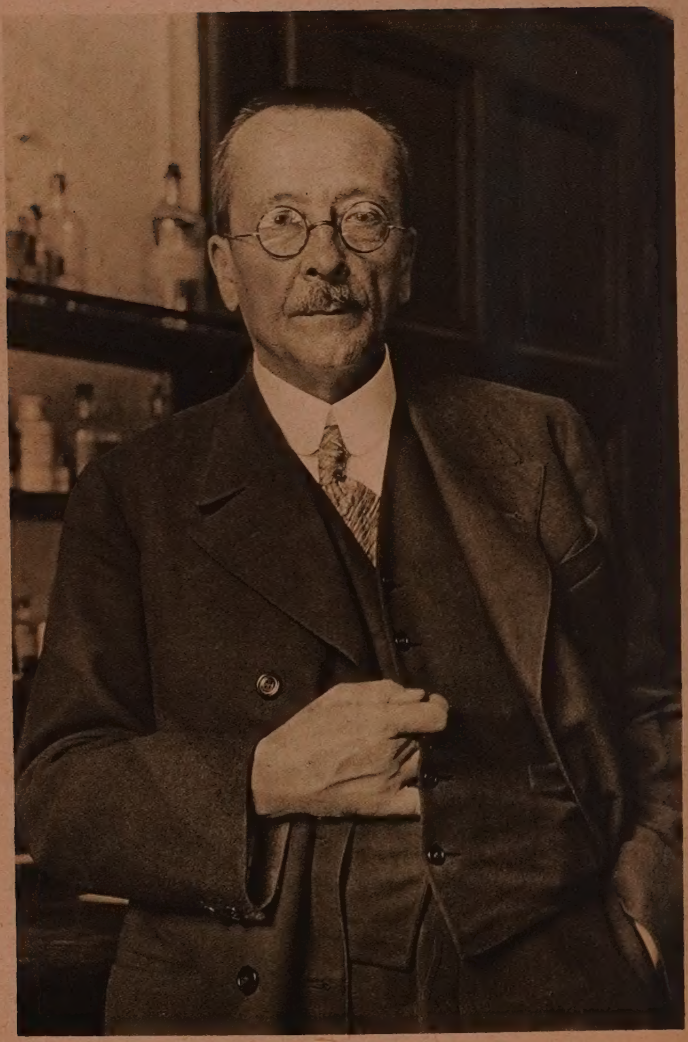
Mit 1 Bildnis, 60 Abbildungen im Text
und zahlreichen Tabellen

EMIL HAIM & CO.
WIEN UND LEIPZIG
1929

Alle Rechte, einschließlich des Rechtes der Übersetzung in die russische Sprache, vorbehalten.

Nachdruck sowie Übersetzung in fremde Sprachen nur mit Bewilligung des Verlegers gestattet.

Printed in Austria.



Fritz Pregl

FRITZ PREGL

ZUM 3. SEPTEMBER 1929.

Als Professor Lieb im Einvernehmen mit anderen Fachgenossen die Anregung gab, anläßlich Ihres sechzigsten Geburtstages im Verlag der Zeitschrift „MIKROCHEMIE" einen Sonderband herauszugeben, fand dieser Gedanke bei den Mitarbeitern und beim Verleger die freundlichste Aufnahme, und wir freuen uns, daß wir Ihnen diese Festschrift heute überreichen können.

Man wird es uns erlassen, hier Ihre Verdienste im einzelnen aufzuzählen. Diese sind der wissenschaftlichen Welt bekannt und haben ihre äußere Anerkennung unter anderem im Jahre 1923 in der Verleihung des Nobel-Preises für Chemie gefunden.

Der Ausbau der Mikromethoden, an dem Sie den hervorragendsten Anteil haben, hat eine ursprünglich kaum geahnte Reihe von Auswirkungen gehabt, Auswirkungen, die selbst in unserer, an großen Entdeckungen

Fritz Spiegl

FRITZ PREGL

ZUM 3. SEPTEMBER 1929.

Als Professor Lieb im Einvernehmen mit anderen Fachgenossen die Anregung gab, anläßlich Ihres sechzigsten Geburtstages im Verlag der Zeitschrift „MIKROCHEMIE“ einen Sonderband herauszugeben, fand dieser Gedanke bei den Mitarbeitern und beim Verleger die freundlichste Aufnahme, und wir freuen uns, daß wir Ihnen diese Festschrift heute überreichen können.

Man wird es uns erlassen, hier Ihre Verdienste im einzelnen aufzuzählen. Diese sind der wissenschaftlichen Welt bekannt und haben ihre äußere Anerkennung unter anderem im Jahre 1923 in der Verleihung des Nobel-Preises für Chemie gefunden.

Der Ausbau der Mikromethoden, an dem Sie den hervorragendsten Anteil haben, hat eine ursprünglich kaum geahnte Reihe von Auswirkungen gehabt, Auswirkungen, die selbst in unserer, an großen Entdeckungen

und Erfindungen so reichen Zeit allgemeine Bewunderung erregen müssen. Unzählige Untersuchungen rein wissenschaftlicher, physiologischer, medizinischer und technischer Richtung sind seit Einführung der Mikroanalyse überhaupt erst ermöglicht worden, und die Zahl der Arbeiten, deren Durchführung Ihre Methoden erleichtert haben, geht wohl in die Tausende; das muß Ihnen die größte Freude und Genugtuung bereiten.

Die Ersparnisse an Material, Zeit und Mühe haben das Tempo des Fortschrittes der Wissenschaft erheblich beschleunigt, und die Mikromethoden sind längst zu einem unentbehrlichen Rüstzeug des Chemikers geworden. Man könnte glauben, daß die größeren Anforderungen, die sie an die Geschicklichkeit des Experimentators stellen, ein Erschwernis für den Forscher bedeuten. Wir glauben aber, daß dieser Einwand durch zwei Vorteile überkompensiert wird: erstens kommt die erworbene Geschicklichkeit („Chemische Asepsis", wie Sie gelegentlich sagten) dem Chemiker auch anderweitig zustatten und damit ist ein Ausgleich für die aufgewandte Mühe gegeben, und zweitens wird in diesem Zusammenhang eine Teilung der Arbeit in die Wege geleitet, indem man jetzt mehr und mehr die analytischen und die präparativen Manipulationen verschiedenen Händen anvertraut und auch auf diesem Wege ökonomischer vorgeht.

Besonderen Dank schuldet Ihnen die Wissenschaft noch für die in Ihrem Werke, „Die quantitative organische Mikroanalyse“, niedergelegten überaus klaren und eingehenden Arbeitsvorschriften.

Nehmen Sie, hochverehrter Herr Jubilar, mit dem Danke für Ihr unablässiges Wirken die herzlichsten Wünsche seitens der Redaktion und des Verlages einer Zeitschrift entgegen, deren Gedeihen in hohem Maße von Ihrer Mitarbeit abhängt.

W. BÖTTGER, F. EMICH, H. EPPINGER,
F. FEIGL, R. STREBINGER, R. WASICKY,

EMIL HAIM.

INHALT:

Seite

FRITZ PREGL zum 3. September 1929 VII

Barrenscheen, H. K., und Frey, Margarete, Zum Nachweis kleinster Wismutmengen im Harn 1

Benedetti-Pichler, A., Beiträge zur Gewichtsanalyse mit der Mikrowaage von Kuhlmann 6

Böttger, Wilhelm, Die Prüfung auf Natrium mit Kaliumantimonat . . 14

Buchtala, J., Die Bedeutung der Mikrochemie in der forensischen Praxis . 20

de Crinis, Max, Eine Methode zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes kleiner Organstücke 25

Denigès, Georges, La céruléo-molybdimétrie méthode de micro-dosage des ions phosphoriques et arséniques 27

Egg, C., und Jung, A., Mikrochemischer Beitrag zur Bakterizidie von Silber und Kupfer 46

Ehrenberg, Rudolf, Zur radiometrischen Mikroanalyse 61

v. Euler, Hans, Hellström, Harry, und Rydbom, Margareta, Bestimmung kleiner Mengen von Carotinoiden 69

Feigl, F., und Krumholz, P., Beiträge zur qualitativen Mikroanalyse von Säuren 77

Flaschenträger, B., Verbesserte Darstellung des Grignard-Reagens zur Mikrobestimmung von OH-Gruppen nach Tschugaeff und Zerewitinoff . 87

Flaschenträger, B., Mikrobestimmung von Glyzerin in Fetten mit der Methode von Zeisel und Fanto 89

Friedrich, A., Über die quantitative mikroanalytische Bestimmung des Schwefels in organischen Substanzen auf maßanalytischem Wege . . . 91

Friedrich, A., Zentrifugenröhrchen mit abnehmbarer Kappe 103

Fuchs, L., und Mayrhofer, A., Über Anwendungsmöglichkeiten verschiedener qualitativer Mikromethoden für die pharmazeutische (toxikologische) Analyse 106

Hahn, F. L., Nachweis und Messung kleinster Magnesiummengen 127

Hernler, Franz, Kurze Mitteilungen zur Mikro-Elementaranalyse nach Pregl 140

Hernler, Franz, Beitrag zur Mikroanalyse organischer Quecksilberverbindungen 154

Kimmelstiel, Paul, Eine Mikromethode zur Bestimmung der Cerebroside 165

Kisser, Josef, Die Bedeutung der Methoden der botanischen Mikrotechnik für die pflanzliche Mikrochemie und Histochemie 178

Klein, Gustav, Ein bewährter Mikroschmelzpunktsapparat 192

Klein, Gustav, und Linser, Hans, Zur Charakteristik und Analytik der Aldehydmethonverbindungen 204

Seite

LAUER, WALTER M., and SUNDE, CONRAD J., An Adaptation of Pregl's Microcombustion to a Semi-microcombustion Method for the Determination of Nitrogen 235

LAUER, WALTER M., and DOBROVOLNY, FRANK J., An Adaptation of Pregl's Microcombustion to a Semi-microcombustion Method for the Determination of Carbon and Hydrogen 243

LEDEBUR, J. FRHR. v., Mikrorespirationsapparat zur gleichzeitigen Bestimmung von O_2 und CO_2 253

LEIPERT, THEODOR, Über die quantitative mikroanalytische Bestimmung von Jod in organischen Substanzen 266

LUNDE, GULBRAND, CLOSS, KARL, und BÖE, JENS, Beiträge zur Mikrojodbestimmung 272

MOSER, LUDWIG, Eine einfache mikroanalytische Trennung von Chlor und Brom 293

PINCUSSEN, L., und ROMAN, W., Eine Methode zur quantitativen mikrochemischen Bestimmung des Silbers in Blut und Organen 296

ROSE, WILLIAM B., and STUCKY, CHARLES J., A Micro Method for the Estimation of Chlorides in Blood 300

ROSENTHALER, L., Mikrochemischer Nachweis und Lokalisations-Ermittlung von Glykosiden 302

RÖTTINGER, A. C., Die Mikrobestimmung des Koffeins im Kaffee 308

RÖTTINGER, A. C., Ein Apparat zur Mikrobestimmung der schwefeligen Säure in Luft 313

STEENHAUER, A. J., Zum Nachweis von Thallium 315

STREBINGER, R., und REIF, W., Die Mikrobestimmung des Magnesiums mit o-Oxychinolin und seine Trennung vom Calcium 319

SZENDRÖ, P., und FLEISCHER, G., Über eine quantitative Mikrobestimmung des Arsens in Leichenteilen 323

VÁSÁRHELYI, BÉLA, Über die Brauchbarkeit der isomeren Aminonaphtholsulfosäuren für die kolorimetrische Phosphorbestimmung 329

ZARIBNICKY, FRANZ, Untersuchungen über proteolytische Wirkung von Hefen 338

Zum Nachweis kleinster Wismutmengen im Harn.

Von **H. K. Barrenscheen** und **Margarete Frey.**

(Aus dem Institut für angewandte medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingelangt am 5. Juli 1929.)

Die Einführung des Wismuts in die Therapie der Lues hat den medizinischen Chemiker vor die Aufgabe gestellt, geringe Mengen des Metalls in den Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen des Organismus nachzuweisen. Es hat sich denn auch eine nicht unbeträchtliche Literatur auf diesem Gebiete entwickelt, welche der Aufgabe mit verschiedenen Methoden gerecht zu werden versuchte, wobei die sonst in der Analytik geübte Arbeitsweise dem biologischen Material angepaßt wurde. So ist von AUBRY[1]) die Reaktion von LÉGER — Fällung des Wismuts als Chinin-Wismut-Kaliumjodid — zu diesem Zwecke herangezogen worden. Von AUBRY selbst wird die Empfindlichkeit der Reaktion mit 1 : 600.000 angegeben. Ihre direkte Anwendung auf den Harn ist jedoch nur bei relativ großen Mengen Wismut möglich und kann häufig, namentlich bei konzentrierteren Harnen zu Irrtümern Anlaß geben. Will man sicher gehen, so muß man wohl nach Zerstörung der organischen Substanz durch Salpetersäure-Schwefelsäure oder Chlorat-Salzsäure das Wismut als Sulfid fällen und die Reaktion in der Lösung des Sulfidniederschlages ausführen. In dieser Weise durchgeführt, ergibt die Reaktion brauchbare Resultate, doch ist die Methode zeitraubend und verlangt relativ viel Material. Nach anderen Prinzipien geht GANASSINI[2]) vor, welcher, soweit aus dem uns zugänglichen Referat ersichtlich ist, die Ausfällung des Wismuts durch Schwefelwasserstoff als nicht beweisend ablehnt und statt dessen das Wismut mit Ammoniak fällt und die Reduktion mit alkalischer Stannitlösung nach VANINO und TREUBERT[3]) zu metallischem Wismut durchführt. Eine Identifizierung erreicht er durch Überführung in Rubidium-Wismutjodid nach BEHRENS oder in Wismutjodid nach KOBELL und CORNWALL. LABAT und PÉRY[4]) lehnen ihrerseits wieder die

[1]) AUBRY, Journ. Pharm. et Chim. 1922, 25, 15—18.
[2]) GANASSINI, Ref. Centralbl. 1923, II., 78.
[3]) VANINO und TREUBERT, B. 31, 1113, 2267, 1898.
[4]) LABAT und PÉRY, Ref. Centralbl. 1924, IV., 2193.

Reaktion von GANASSINI ab und schlagen folgenden Weg ein: Nach Zerstörung der organischen Substanz mit $HNO_3 - H_2SO_4$ fällen sie das Wismut als Sulfid mit H_2S und prüfen nach Zerlegung des Sulfidniederschlages mit Salpetersäure mit Hexamethylentetramin, wobei sie auf eine Empfindlichkeit von 0,002 mg kommen wollen. Mit der quantitativen Bestimmung und den Ausscheidungsverhältnissen befaßt sich schließlich eine Reihe von Arbeiten von H. MÜLLER und KÜRTHY[5]), ohne jedoch für den Nachweis des Wismuts neue Gesichtspunkte beizubringen.

Vor kurzem hat nun F. FEIGL[6]) einen äußerst empfindlichen und eleganten Nachweis von geringen Wismutspuren durch die induzierte Reduktion von Bleisalzen angegeben. Es erschien uns aussichtsreich, diese einfache und dabei einwandfreie Reaktion auf ihre Anwendungsmöglichkeit für biologisches Material zu prüfen. Im nachstehenden soll über die Ergebnisse dieser Untersuchung, die zunächst den Nachweis geringster Wismutspuren im Harn zum Gegenstand haben, berichtet werden.

Zunächst richteten wir unser Augenmerk darauf, die zeit- und materialraubende Veraschung des Harns zu umgehen. Es war naheliegend, den von FAIRHALL[7]) für den Nachweis des Bleies eingeschlagenen Weg auch für den Nachweis des Wismuts zu versuchen, dies um so mehr, als die Fällung des Wismuts als Phosphat eine in der analytischen Chemie gangbare quantitative Methode darstellt. Vorversuche an Harnen, denen wir größere Mengen von Wismutnitrat zusetzten und in denen durch Zusatz von Ammoniak die Ausfällung der Erdalkaliphosphate bewirkt wurde, ergaben nun, daß es gelingt, auf diese Weise das Wismut quantitativ in den Phosphatniederschlag überzuführen. Nach diesen Vorversuchen lag der einzuschlagende Weg klar vor uns. Im folgenden soll die Methode beschrieben werden, die sich uns nach einer Reihe von Versuchen als absolut einwandfrei und sicher erwiesen hat.

Von den auf Wismut zu prüfenden Harnen werden 100 ccm mit drei Tropfen einer 3%igen Lösung von Bleiazetat und mit Ammoniak bis zur stark ammoniakalischen Reaktion versetzt. Nach kurzem Stehen zentrifugiert man den Phosphatniederschlag

[5]) H. MÜLLER und KÜRTHY, Biochem. Zeitschr. 147, 377—84, 1924, ibid. 385—89, ibid. 149, 235—38 und 239—44, 1924.

[6]) F. FEIGL, B. 62, 1140, 1929.

[7]) FAIRHALL, Journ. of biolog. Chem. 60, 481, 1924.

ab, die überstehende Flüssigkeit wird abgegossen, der Niederschlag in wenig konzentrierter Salpetersäure aufgenommen und in einer Quarzschale verascht. Die Veraschung erfordert bei den geringen Mengen organischer Substanz, die vom Niederschlag eingeschlossen werden, nur wenige Minuten. Die reinweiße Asche wird in der eben notwendigen Menge konzentrierter Salzsäure gelöst, die geringen Bleimengen lösen sich hierbei anstandslos. Nach entsprechender Verdünnung mit destilliertem Wasser prüft man einen Teil (zirka 5 ccm) der Lösung mit der jedesmal frisch zu bereitenden alkalischen Stannitlösung, wie sie von FEIGL angegeben wird (gleiche Mengen 25%iger Natronlauge und einer Lösung, die 5 g Stannochlorid in 5 ccm konzentrierter Salzsäure gelöst auf 90 ccm Wasser enthält). Die auf Zusatz der alkalischen Stannitlösung ausfallenden Erdalkaliphosphate stören die Reaktion in keiner Weise, im Gegenteil, es wird durch den Phosphatniederschlag die Beurteilung wesentlich erleichtert, indem offenbar das bei der Reduktion des Wismuthydroxyds durch Stannit gebildete Wismut an die Oberfläche der Phosphate adsorbiert wird und so besonders wirksame Kristallisationskeime für das Blei geschaffen werden. Während bei größeren Wismutmengen der Phosphatniederschlag sich augenblicklich tief schwarz färbt, sieht man bei den minimalsten Mengen, besonders bei auffallendem Licht gegen weißen Hintergrund, zunächst auf einzelnen der Phosphatflocken schwarze Pünktchen auftauchen, bis dann allmählich der ganze Niederschlag, je nach der Menge des vorhandenen Wismuts, sich bräunlich bis braunschwarz verfärbt. Störungen durch die im normalen Harn enthaltenen geringen Mengen von Eisen, bezw. Kupfer sind, wie wiederholt ausgeführte Kontrolluntersuchungen an normalen Harnen zeigten, nicht zu befürchten. Die enorme Empfindlichkeit der Reaktion zeigt nachfolgende Untersuchungsreihe, welche mit Zusatz von bekannten Wismutmengen zu normalem Harn durchgeführt wurden. Als Zusatz wurde eine Wismutnitratlösung verwendet, deren Gehalt an metallischem Wismut, gravimetrisch kontrolliert, 1 mg Bi pro ccm entsprach und von der in exakten Meßkolben mit geeichten Pipetten die entsprechenden Verdünnungen hergestellt wurden.

100 ccm Harn + 1 ccm der Wismutstammlösung = 1 mg Bi; Aschenlösung auf 100 ccm aufgefüllt, davon 5 ccm, entsprechend 0,05 mg Wismut, verwendet. Augenblickliche Schwarzfäbung des Niederschlages.

100 ccm Harn + 1 ccm der zehnfach verdünnten Wismutstammlösung = 0,1 mg Bi. Aschenlösung auf 100 ccm aufgefüllt, davon zur Reaktion 5 ccm, entsprechend 0,005 mg Bi. Augenblickliche Schwarzfärbung des Niederschlages.

100 ccm Harn + 1 ccm der hundertfach verdünnten Wismutstammlösung = 0,01 mg Bi. Aschenlösung auf 100 ccm aufgefüllt, davon 5 ccm = 0,0005 mg Bi untersucht. Nach wenigen Sekunden Braunfärbung des Niederschlages.

100 ccm Harn + 1 ccm der Wismutstammlösung 1 : 1000 =

Name und Nummer des Patienten	Injizierte Menge Bismogenol	Tage seit der letzten Injektion	Verwendete Mengen Harn in ccm	Ausfall der Reaktion
B. I.	$^1/_2$	2	10	nach 1 Minute Schwarzfärbung
Fr. II.	$2^1/_2$	2	10	Nach 30 Sekunden Schwarzfärbung
T. III.	$2^1/_2$	0	5	Momentane Schwarzfärbung
P. IV.	$3^1/_2$	2	5	Nach 10 Sekunden Schwarzfärbung
F. V.	$3^1/_2$	3	10	Nach 30 Sekunden Schwarzfärbung
A. VI.	$4^1/_2$	2	5	Nach 10 Sekunden Schwarzfärbung
F. VII.	5	3	5	Nach 5 Minuten Braunfärbung
Br. VIII.	5	3	5	Nach 5 Sekunden Schwarzfärbung
Ho. IX.	$5^1/_2$	0	2	Nach 5 Minuten deutliche Braunfärbung
N. X.	$7^1/_2$	0	10	Momentane Schwarzfärbung
G. XI.	$7^1/_2$	0	2	Momentane Schwarzfärbung
W. XII.	$7^1/_2$	2	10	Momentane Schwarzfärbung
Hu. XIII.	$7^1/_2$	0	1	Momentane Braunfärbung Nach 1 Minute Schwarzfärbung

0,001 mg Bi. Ausführung wie oben. 5 ccm der Aschenlösung entsprechen 0,00005 mg Bi. Nach zwei Minuten deutliche Verfärbung einzelner Flocken, nach weiteren drei bis vier Minuten der ganze Niederschlag deutlich bräunlich gefärbt. Empfindlichkeit 1 : 20,000.000.

Es zeigt sich also, daß selbst bei der minimalen Menge von 1 γ Bi in 100 ccm Harn der Nachweis des Wismuts einwandfrei zu führen ist. Auch bei der Untersuchung des Harns von mit Wismut behandelten Patienten ergibt die Methode einwandfreie Resultate. Durch das Entgegenkommen der Klinik ARZT*) waren wir in der Lage, eine größere Reihe von Harnen von Patienten, die mit Bismogenol behandelt worden waren, zu untersuchen. Die vorstehende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltenen Resultate und zeigt gleichzeitig die Leistungsfähigkeit der Methode.

Wie ersichtlich, läßt sich selbst in so minimalen Mengen wie 1 ccm Harn das Wismut einwandfrei nachweisen. Weitere Untersuchungen haben uns gezeigt, daß die Veraschung des Phosphatniederschlages nicht unbedingt nötig ist, sondern, daß die Reaktion auch nach Auswaschen und Lösen des Niederschlages in wenigen Tropfen konzentrierter Salzsäure durchführbar ist. Hier wäre freilich zu bedenken, daß eventuell die Gegenwart von Quecksilber den Wismutnachweis fälschen könnte. Wenn uns auch Kontrolluntersuchungen, die wir an mit größeren Mengen Sublimat versetzten Harnen durchführten, keinen Anhaltspunkt dafür ergaben, daß das Quecksilber mit in den Phosphatniederschlag eingeht, möchten wir doch raten, in den Fällen, in denen Wismut neben Quecksilber nachzuweisen ist, von der Veraschung Gebrauch zu machen.

Gegenüber den bisher üblichen Methoden des Wismutnachweises scheint uns die Anwendung der von FEIGL empfohlenen induzierten Reaktion in der hier angegebenen Weise wesentliche Vorteile zu besitzen. Sie erspart die Veraschung größerer Mengen von Harn, ist absolut spezifisch — auch Arsen und Antimon stören nicht — und übertrifft die bisher geübten Nachweismethoden um ein Vielfaches an Empfindlichkeit. Ihr weiterer Vorteil ist die Raschheit des Nachweises, der sich innerhalb von 15 Minuten mit Leichtigkeit erbringen läßt.

*) Herrn Assistent Dr. MATRAS möchten wir auch an dieser Stelle für die Überlassung des Materials unseren besten Dank aussprechen.

Beiträge zur Gewichtsanalyse mit der Mikrowaage von Kuhlmann.

Von **A. Benedetti-Pichler.**

(Aus dem Laboratorium für allgem. Chemie an der Techn. Hochschule in Graz.)

(Eingelangt am 3. Juli 1929.)

1. Über das Trocknen der Niederschläge.

Im hiesigen Institut wird zur Niederschlagsbehandlung beim Arbeiten mit der mikrochemischen Waage von Wilh. H. F. Kuhlmann fast ausschließlich das Filterstäbchen von F. Emich benutzt. Die Fällung erfolgt bekanntlich[1]) in einem Mikrobecher, die Lösung und die Waschflüssigkeiten werden durch den Tauchfilter, das Filter- oder Saugstäbchen, abgezogen. Der gewaschene Niederschlag befindet sich schließlich zum Teil auf der Filterschichte des Stäbchens, nicht unbeträchtliche Mengen bleiben auch häufig im Becher zurück. Becher und Stäbchen werden mit dem Niederschlag zusammen getrocknet und gewogen. Das Trocknen erfolgte bis vor kurzem in einem gewöhnlichen Trockenschrank, obschon Professor Dr. F. Emich bereits vor Jahren empfahl, es in einem Glasrohr unter Durchsaugen von Luft vorzunehmen.

Der Versuch bewies mir nun, daß die letzterwähnte Trockenmethode außerordentlich vorteilhaft ist. Das Trocknen erfolgt in sehr kurzer Zeit, die Apparate sind vor Staub geschützt und außerdem kann das Trocknen ohne jede Änderung der Apparatur in jedem beliebigen Gasstrom erfolgen. Die Abb. zeigt die Trockenvorrichtung[2]), die sich nun seit einem halben Jahre bei den verschiedensten Bestimmungen bewährt hat. Das Trockenrohr T wird in dem mit Gas geheizten Aluminiumblock, der dem Regenerierungsblock von F. Pregl[3]) nachgebildet ist, durch die beiden Korke[4]) K gehalten. Die beiden Korke werden beim Einlegen des

[1]) F. Emich, Mikrochemisches Praktikum. S. 63. München 1924; Lehrbuch der Mikrochemie. S. 84. München 1926.

[2]) Die Trockenvorrichtung kann vom Mechaniker K. Schmitt, Graz, Lessingstraße 25, bezogen werden.

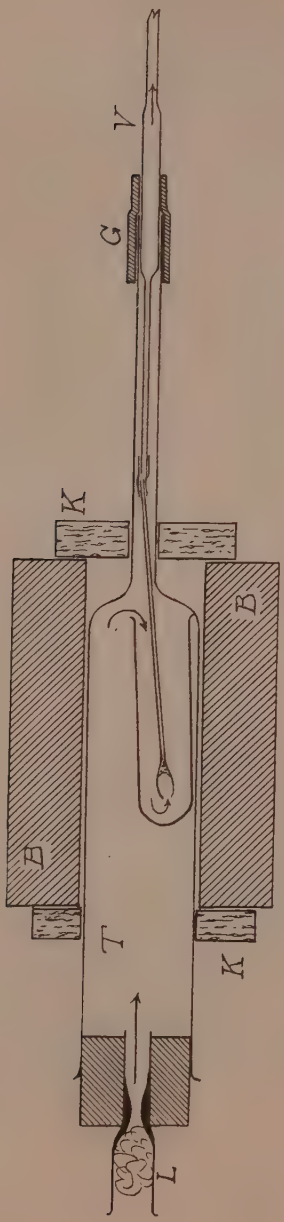
[3]) F. Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse, Berlin 1923.

[4]) Vergl. auch hierzu die Befestigung des F. Pregl'schen Mikroexsiccators im Regenerierungsblock.

Rohres an den Block angedrückt. Die Reibung an den Seitenwänden des Blockes verhindert das Rollen des Trockenrohres.

Um Becher und Stäbchen in das Trockenrohr einzuführen, nimmt man letzteres aus dem Block heraus und legt es auf den Arbeitstisch. Je eine ebene Fläche an den Korken K gibt auch in diesem Falle dem Rohr eine sichere Lage. Der Gummistopfen bei L wird entfernt und das Verbindungsrohr V so weit in das Trockenrohr eingeschoben, daß das normalerweise im Trockenrohr befindliche Ende aus der Mündung des weiten Rohres bei L herausragt. Mit Hilfe eines Gummischläuchchens wird das aus der Mündung des Mikrobechers herausstehende Ende des Filterstäbchens angeschlossen. Dann ergreift man mit der rechten Hand das Verbindungsrohr bei V und zieht mit Hilfe desselben das Filterstäbchen in das Trockenrohr hinein, während man gleichzeitig mit den Fingern der linken Hand den Becher derart nachschiebt, daß das Saugstäbchen stets den Boden des Bechers berührt. Die mit der Innenseite des Bechers in Berührung gekommenen Teile des Filterstäbchens müssen selbstredend immer im Becher belassen werden, da man sonst Niederschlagsverluste zu befürchten hätte. Schließlich führt man den Stopfen mit dem Luftfilter L ein und setzt die Vakuumpumpe, mit der V stets durch einen Schlauch von 2 mm Innen- und 4 mm Außendurchmesser verbunden ist, in Tätigkeit. Dann erst bringt man das Trockenrohr in den auf die gewünschte Trocknungstemperatur erhitzten Block.

Der Weg, den der durchgesaugte Luftstrom nimmt, ist in der Abbildung durch Pfeile angedeutet. Selbstverständlich muß die Gummischlauchverbindung bei G gasdicht sein. Damit das Verbindungsrohr V aber trotzdem leicht beweglich bleibt, besitzt es nur über eine kurze Strecke die für das Dichthalten der Verbindung G erforderliche Weite. Das Verbindungsrohr muß natürlich länger sein als das Trockenrohr. Ferner ist erforderlich, daß das Schlauchstück, welches den Anschluß des Filterstäbchens an das Verbindungsrohr vermittelt, sich bereits außerhalb des erhitzten Rohrteiles jenseits des Korkes K befindet. Da der Kopf des Stäbchens gleichzeitig den Boden des Mikrobechers berühren soll, muß der Stiel der Filterstäbchen wenigstens 90 mm lang genommen werden. In das Luftfilter L kommt ein Bausch langfaseriger Watte. Das Lumen des Luftfilterrohres lasse man nur auf etwa 1 mm zusammenfallen. Ein irgend höheres Vakuum ist im Trocknungsraum nicht vorteilhaft. Die im Becher befindlichen Reste der


V
G
K
B
B
T
K
L

Waschflüssigkeit verdampfen dann zu rasch und man erhält unerwünschte Kondensate an allen kalt gehaltenen Teilen des Trockenrohres. Will man im späteren Verlauf des Trocknens das Vakuum verstärken, so kann dies jederzeit erfolgen, indem man in die äußere Mündung des Luftfilters einen Stopfen mit einer feinen Kapillare einsetzt. In ähnlicher Weise kann auch die Verbindung mit einer geeigneten Gasquelle erfolgen, wenn die Trocknung nicht in Luft, sondern in einem anderen Gase vorgenommen werden soll.

2. Bestimmung des Aluminiums.

Die gewichtsanalytische Bestimmung kleiner Aluminiummengen bot vor der Entdeckung der hervorragenden Eignung der 8-Oxychinolinverbindung[5]) als Wägungsform beträchtliche Schwierigkeiten. Zwar war es J. Donau[6]) bereits im Jahre 1911 gelungen, das Aluminium als Aluminiumoxyd zur Wägung zu bringen. J. Donau sammelte das Oxydhydrat in einem kleinen Filterschälchen aus Platinfolie. Der zunächst gut getrocknete Niederschlag konnte in den leichten Schälchen heftig geglüht werden. Da ferner zur Wägung Nernst-Waagen benutzt wurden, deren Gehäuse gut abgedichtet und mit Trockenmitteln beschickt war, konnte auch der Absorption von Wasserdampf durch das geglühte Aluminiumoxyd begegnet werden.

Als nun der Verfasser vor mehreren Jahren den Versuch unternahm, unter Benutzung der Kuhlmann-Waage die Bestimmung des Aluminiums durch Wägung des Oxydes durchzuführen, wurden zunächst ganz unbrauchbare Resultate erhalten. Eine Nachprüfung des entsprechenden Makroverfahrens (das Hydroxyd wurde stets aus sulfathaltigen Lösungen ausgefällt) führte zu den folgenden Feststellungen[7]):

1. Durch andauerndes Erhitzen eines Aluminiumoxydhydratniederschlages auf Gelbglut erhält man nie reines Aluminiumoxyd. Das Glühprodukt ist stark hygroskopisch und enthält bekanntlich, falls die Fällung aus sulfathaltiger Lösung erfolgte, auch stets Schwefelsäure. Erst durch Erhitzen auf beginnende Weißglut wird ein Oxyd erhalten, das nur mehr wenig hygroskopisch ist und keine

[5]) B. Berg, Ztschrft. f. analyt. Chem., *71*, 369 (1927); F. L. Hahn und K. Vieweg, ebenda, Seite 122.

[6]) Monatshefte für Chemie, *32*, 1115 (1911).

[7]) Man sehe hierzu noch die Arbeiten von: F. L. Hahn mit H. Brunee, Ztschrft. f. analyt. Chem., *71*, 125 (1927), und G. Jander u. O. Ruperti, Ztschrft. f. anorgan. Chem., *153*, 253 (1926).

Schwefelsäure mehr enthält. Doch auch dieses Oxyd enthält, wenn man es nicht in gut verschlossenen Gefäßen zur Wägung bringt, stets etwa 0,5% Wasser. Dieser Wassergehalt des zur Wägung gelangenden Oxydes gleicht vermutlich in vielen Fällen die Aluminiumverluste zufolge der Löslichkeit des Oxydhydrates in ammoniakalischen Flüssigkeiten aus.

2. Ferrioxyd wird bereits durch Erhitzen des Oxydhydrates auf Gelbglut gewichtskonstant erhalten. Erhitzt man es in einem offenen Platintiegel vor dem Gebläse zur beginnenden Weißglut, so tritt keine feststellbare Reduktion des Ferrioxydes ein. Man ist also berechtigt, auch Gemische von Aluminium und Ferrioxyd vor dem Gebläse bis zur beginnenden Weißglut zu erhitzen. Enthält das Oxydgemisch mindestens 50% Ferrioxyd, so erhält man aber auch bereits bei zweistündigem Erhitzen auf Gelbglut Gewichtskonstanz. Die so erhaltenen Oxyde sind nur mehr wenig hygroskopisch, doch besitzen sie noch um etwa 1% zu hohes Gewicht.

3. Nach Wynkoop und Schirm gefälltes Aluminiumoxydhydrat verhält sich beim Glühen ebenso wie das mit Ammoniak gefällte Hydrat.

Da nun jedes Gefäßmaterial beim Erhitzen auf beginnende Weißglut merkliche Gewichtsabnahmen zeigt, blieb nur der Weg offen, vor Ausfällung des Aluminiumhydroxydes eine bekannte Menge Eisen zuzusetzen und das Gemisch der Oxydhydrate nach zweistündigem Erhitzen auf Gelbglut zur Wägung zu bringen[8]). Doch läßt auch dieses Verfahren gute Resultate nicht erwarten, wie aus dem oben unter „2." Gesagtem hervorgeht. Daher wurde versucht, die Bestimmung des Aluminiums durch Wägung des Innerkomplexsalzes mit 8-Oxychinolin auf den Mikromaßstab zu übertragen. Dabei waren vorzügliche Resultate zu erwarten, da diese Wägungsform nur 5,87% Aluminium (11,10% Al_2O_3) enthält, mithin Wägefehler bei irgend größeren Aluminiummengen nicht mehr ins Gewicht fallen.

Bei einigen orientierenden Versuchen mit größeren Einwagen konnte zunächst festgestellt werden, daß man stets zu wenig Aluminium findet, wenn man den Niederschlag nach F. L. Hahn und K. Vieweg[9]) mit Normal-Essigsäure, bezw. verdünnterer Essigsäure wäscht. Das Komplexsalz ist darin merklich löslich, was verständlich ist, da die n-Essigsäure eine höhere Wasserstoffionenkonzentration besitzt als die mit Azetat im Überschuß versetzte Lösung, aus der das Komplexsalz quantitativ ausfällt.

Die weiteren Versuche wurden in Anlehnung an eine von I. M. Kolthoff und E. B. Sandell[10]) gegebene Vorschrift für die

[8]) Vergl. F. Emich, Lehrbuch der Mikrochemie. S. 165. München 1926.

[9]) Ztschrft. f. analyt. Chem., *71*, 124 (1927).

[10]) Journ. Americ. Chem. Soc., *50*, 1900 (1928).

Trennung von Aluminium und Beryllium mit Hilfe von 8-Oxychinolin ausgeführt. Zur Herstellung des „Oxinreagens" verreibt man 5 g 8-Oxychinolin (C. A. F. Kahlbaum, Berlin) mit 12 g Eisessig und setzt dann 83 g Wasser zu, wobei (eventuell nach gelindem Erwärmen) vollständige Auflösung eintritt. Ferner stellt man durch Auflösen von 154 g Ammoniumazetat in Wasser und Auffüllen auf einen Liter eine 2-n-Ammonazetatlösung her.

Für eine Makrobestimmung wägt man am besten nur so viel Substanz ein, daß maximal 0,1 g Aluminiumoxyd zur Ausfällung gelangen. Die schwach mineralsaure Lösung wird auf etwa 150 ccm verdünnt und je 0,05 g enthaltenem Aluminiumoxyd mit 15 ccm „Oxinreagens" versetzt. Dann erhitzt man die Lösung zum Sieden, bringt sie auf ein kochendes Wasserbad und versetzt hier unter Umrühren mit dem Glasstab tropfenweise mit der 2-n-Ammonazetatlösung. Sobald eine Trübung bestehen bleibt, hält man mit dem weiteren Reagenszusatz so lange ein, bis die Fällung kristallinisch erscheint, was meist nach einer Minute eintritt. Nun werden langsam weitere 25 ccm der Ammonazetatlösung pro 0,05 g Aluminiumoxyd zugesetzt, worauf man die Fällung noch zehn Minuten auf dem siedenden Wasserbad stehen läßt. Der Niederschlag erscheint schließlich grobkristallinisch und rein gelb (Spuren von Eisen verraten sich dadurch, daß sie der Fällung eine schmutzig-graugelbe Färbung erteilen). Endlich wird die heiße Lösung durch einen Glasfiltertiegel (Schott & Gen., Jena) 1G4 filtriert[11]). Der Niederschlag wird am besten mit Hilfe des Filtrates quantitativ in den Filtertiegel übergeführt. Dann erst wäscht man den Niederschlag im Tiegel, indem man das Vakuum aufhebt, 10 ccm heißes Wasser in den Filtertiegel einbringt, mit einem Glasstab den Niederschlag mit dem Waschwasser gut verrührt und dann wieder trocken saugt. In gleicher Weise wird das Waschen viermal mit je 5 ccm kaltem Wasser wiederholt. Selbstverständlich ist bei Gelegenheit des letzten Waschens der benutzte Glasstab in den Tiegel hinein abzuspülen; festhaftende Niederschlagsteile werden unter Benutzung eines Gummiwischers losgelöst. Nach drei- bis vierstündigem Trocknen bei 140° C ist der Niederschlag gewichtskonstant. Ich fand auf die beschriebene Weise in Proben von je 0,5 g Kaliumalaun: 10,78, 10,74, 10,68 und 10,76% Aluminiumoxyd (Theorie: 10,77%). Wurde nach F. L. Hahn und K. Vieweg mit stark verdünnter Essigsäure gewaschen, so erhielt ich Zahlen, wie: 10,28, 10,42 und 10,68% Al_2O_3; dabei kamen aber insgesamt nicht mehr als 20 ccm Waschflüssigkeit je Analyse zur Verwendung.

Entsprechend der beschriebenen Makroarbeitsweise wurde auch bei den Mikroversuchen vorgegangen. 1 bis 6 mg Kaliumalaun (entsprechend 0,1 bis 0,6 mg Aluminiumoxyd) wurden in den Mikrobecher eingewogen, in etwa 1 ccm Wasser gelöst, mit einem Tropfen konzentrierter Salzsäure und 0,3 ccm „Oxinreagens" versetzt. Dann wurde auf dem siedenden Wasserbade mit 2-n-Ammonazetat erst tropfenweise bis zur ersten bleibenden

[11]) Es könnte auch mit einem Makrofilterstäbchen gearbeitet werden. Vergleiche H. Häusler, Ztschrft. f. analyt. Chem., *64*, 372 (1924).

Trübung und nach einer Minute Wartezeit, innerhalb welcher die Trübung kristallinisch zu werden pflegt, tropfenweise mit noch 0,5 ccm der Azetatlösung versetzt. Alle Volumenangaben sind der Gegenwart von 1 mg Aluminiumoxyd angepaßt; ist mehr Aluminium zugegen, so müssen die Lösungsmengen sinngemäß vergrößert werden. Nach beendeter Fällung läßt man noch zehn Minuten auf dem siedenden Wasserbade stehen. Dann wird die über dem nun grobkristallinisch gewordenen Niederschlag stehende Lösung heiß durch das Filterstäbchen abgezogen und der Niederschlag möglichst trocken gesaugt. Gewaschen wird vier- bis fünfmal mit je etwa 0,25 bis 0,5 ccm heißen Wassers. Asbestfilterstäbchen eignen sich für die Behandlung der Aluminium-Oxychinolinverbindung sehr gut. Das Filtrieren und Auswaschen ist leicht in fünf Minuten zu erledigen. Hernach wird in der oben beschriebenen Trockenvorrichtung unter Durchsaugen von Luft fünf Minuten auf 140° C erhitzt. Danach können Becher und Stäbchen in der üblichen Weise für die Wägung vorbereitet werden. Die Trocknungsdauer wird also durch das Arbeiten mit kleinen Mengen um wenigstens drei Stunden verkürzt.

Im nachstehenden seien einige Analysen in chronologischer Reihenfolge angeführt:

mg KAl $(SO_4)_2.12$ aq:	mg Oxinverbindung:	% Al_2O_3:	Experimentator:
6,456	6,244	10,74	Verfasser.
4,280	4,155	10,77	E. Wiesenberger, Graz.
4,317	4,174	10,73	V. Frangesch, Mitterberg.
3,387	3,291	10,77	Janet Brown, London.
2,996	2,920	10,81	Margit Hegedüs, Budapest.
1,725	1,688	10,86	Margit Hegedüs, Budapest.
1,922	1,865	10,77	Dr. Srikantia, Bengalore.
4,307	4,200	10,82	Verfasser.
1,990	1,938	10,81	Verfasser.
	Theorie	*10,77*	

Es ist zu erwarten, daß auf diese Weise eine Trennung von Aluminium und Beryllium[12]) auch mit kleinen Substanzmengen ohne weiteres wird durchgeführt werden können.

Eisensalze werden unter den angegebenen Bedingungen ebenfalls quantitativ gefällt. Es liegt somit die Möglichkeit vor, durch

[12]) Vergl. hierzu auch M. Niessner, Ztschrft. f. analyt. Chem., *76*, 135 (1929).

Fällung mit Oxychinolin die „Summe“ von Eisen plus Aluminium zu bestimmen. Das Eisen kann titriert und das Gewicht der entsprechenden Eisen-Oxychinolinverbindung in Abzug gebracht werden. Leider ist dieser Weg vorläufig in der Mikroanalyse nur dann gangbar, wenn w e n i g E i s e n neben viel Aluminium vorhanden ist. Der (schwarze) Eisenniederschlag ist nämlich viel schwieriger zu filtrieren. Und je mehr das Eisen überwiegt, desto unangenehmer wird die Behandlung des Niederschlages auch bei gleichzeitiger Anwesenheit von Aluminium. Doch sollen die diesbezüglichen Versuche noch fortgesetzt werden.

Die Prüfung auf Natrium mit Kaliumantimonat.

Von **Wilhelm Böttger.**

(Aus der Chemischen Abteilung des Physik.-chem. Instituts der Universität Leipzig.)

(Eingelangt am 2. Juli 1929.)

Der Nachweis des Natriums mittels K-Antimonat gilt bekanntlich als eine unsichere Reaktion. Als besonders störend wird der Umstand angesehen, daß bis zum Eintreten einer unverkennbaren Abscheidung längere Zeit verstreicht, wenn nicht von einer ziemlich konzentrierten Lösung des Natriumsalzes ausgegangen wird.

Im folgenden soll gezeigt werden, daß für die mikrochemische Ausführung der Reaktion gerade das Gegenteil zutrifft. Man erhält so rasch eine kristallinische Abscheidung von charakteristischer Beschaffenheit, daß über die An- oder Abwesenheit von Na-Salzen im Verlaufe einiger Minuten eine ganz eindeutige Entscheidung getroffen werden kann. Ein Hinweis auf die mikrochemische Charakterisierung des Na-Antimonats findet sich bereits in der „Anleitung zur qualitativen chemischen Analyse" von C. R. Fresenius[1]). Es ist an dieser Stelle jedoch nicht auf den sehr wesentlichen Umstand hingewiesen, daß die Kristallbildung mit so großer Geschwindigkeit erfolgt, daß die ersten, allerdings noch im Wachstum begriffenen, Kristalle bereits in der kurzen Zeit (es handelt sich um Bruchteile einer Minute) auftreten, die verstreicht, um den Objektträger gleich nach Zugabe des Reagens auf den Tisch des bereits auf das Objekt eingestellten Mikroskops zu bringen. Das prompte Auftreten der Kristalle dürfte mit der befolgten Ausführungsweise zusammenhängen: Man dampft eine kleine Menge der auf Natrium zu prüfenden Lösung, die nicht sauer reagieren darf, zur Trockne, bringt von dem Rückstand ein kaum sichtbares Körnchen auf den Objektträger und gibt dazu ein Tröpfchen von dem Reagens. Die Größe des Tropfens richtet sich nach

[1]) Fresenius, Qualitative Analyse, 17. Auflage, S. 119. — Auch in dem Buche von Behrens Kley: Mikrochemische Analyse I, S. 35 (1915) finden sich, wie ich erst nachträglich bemerke, Angaben über die mikrochemische Prüfung auf Na mittels K-Antimonat. Doch ist an dieser Stelle nichts über die hier betonten Momente gesagt.

der Menge des festen Rückstandes. Da das Na-Antimonat nicht zu den besonders wenig löslichen Stoffen gehört, muß darauf gehalten werden, daß nur so viel Reagens zugesetzt wird, daß es zur

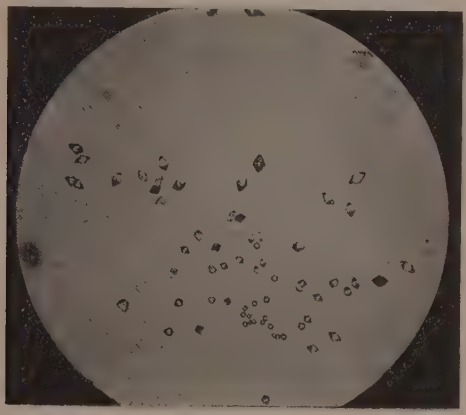


Abbildung 1.

Übersättigung kommt. Besonders wenn man etwa nur einen Tropfen einer verdünnten Na-Salzlösung eingedampft hat, sollte nur recht wenig Reagens (etwa $^1/_{10}$ Tropfen) zugesetzt werden.

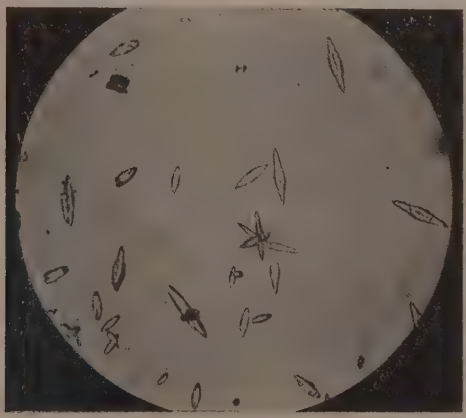


Abbildung 2.

Es gelingt so unschwer, mit $^1/_{1000}$ mg Na eine sehr deutliche Kristallisation zu erhalten.

Die Form der Kristalle hängt offenbar von dem Grad der Übersättigung ab. Wenn man eine aus grobkörnigem K-Antimonat bereitete Lösung benutzt, erhält man häufiger die stabilere Form (Oktaeder), die in Abbildung 1 dargestellt ist, während vorwiegend sägebock-, zigarren- oder wetzsteinförmige Gebilde (Abbildung 2) auftreten, wenn eine aus sehr feinkörnigem (mehligem) K-Antimonat bereitete Lösung verwendet wird.

Kaliumsalze sind nicht von Nachteil; ich habe auch mit Mischungen, die aus 1% NaCl und 99% KCl bestanden, einen deutlichen Ausfall der Reaktion erhalten. Es ist dann allerdings darauf zu achten, daß nicht zuviel Reagens angewendet wird. Es muß unter Umständen vermieden werden, daß völlige Auflösung des auf den Objektträger gebrachten Materials eintritt. Und weiter ist in diesem Falle damit zu rechnen, daß die charakteristischen, in ihrer Form etwas abweichenden Kristalle nur eine gewisse Zeit erkennbar sind, weil sie naturgemäß beim Verdunsten des Lösungsmittels durch das auskristallisierende, leichter lösliche K-Salz verdeckt werden können. — Ein besonderer Einfluß des Anions ist bisher nicht beobachtet worden. — Mg-Salze wirken störend, da sie ebenfalls eine kristallinische Abscheidung geben, die das Erkennen von Na-Antimonat verhindert. Mg-Salze sind daher vor der Prüfung auf Na zu entfernen.

Wesentlich für das Gelingen des Nachweises ist die Beschaffenheit der K-Antimonatlösung. Es hat sich öfter gezeigt, daß die Bildung der charakteristischen Formen ausblieb, wenn eine schwach getrübte Lösung angewendet wurde. Es sollen daher hier auch einige Ergebnisse aus einer Untersuchung erwähnt werden, die Herr Dr. Johannes Piater (Wolfen) während seiner Tätigkeit als Assistent in der chemischen Abteilung des Physik.-chem. Instituts der Universität Leipzig über den zeitlichen Verlauf der Auflösung des K-Antimonats und über das Verhalten der verschiedenen Lösungen auf meine Veranlassung ausgeführt hat.

Die Auflösung erfolgt bei Zimmertemperatur außerordentlich langsam. Mit einem feinkörnigen Präparat (3 g), das bereits zweimal zum Sättigen von 30 ccm Wasser gedient hatte und daher gut ausgewaschen war, konnte festgestellt werden, daß die Sättigung von 30 ccm Wasser (allerdings bei nur mehrmaligem Umschütteln am Tage) nach sieben Tagen noch nicht erreicht war (das heißt, es fand noch Zunahme des Leitvermögens statt) und daß es vorher infolge Hydrolyse zu einer Trübung der Lösung kam.

Beim Erwärmen auf 100° ist bereits in einigen (etwa fünf) Minuten fast ebensoviel von dem Salz gelöst wie nach sechs Tagen bei Zimmertemperatur.

Die Geschwindigkeit der Auflösung hängt ferner in hohem Maße von der Beschaffenheit des Präparats ab. Mit einem sehr feinkörnigen Präparat (von mehliger Beschaffenheit) wird bereits in zehn Miunten beim Erwärmen auf 50° nahezu Sättigung erreicht, während von einem grobkörnigen Präparat von grießartiger Beschaffenheit in derselben Zeit etwa nur der vierte Teil von der Menge in Lösung geht, die von dem feinkörnigen Präparat an das Lösungsmittel abgegeben wird.

In dieser Beziehung und über das Verhalten der Lösungen gegen Lackmus sind in der letzten Zeit noch die folgenden Feststellungen gemacht worden. Wenn man z. B. je 1 g des Präparats mit 10 ccm Wasser von 50° ansetzt und 15 Minuten lang in einem Becherglase mit Wasser von 50° unter lebhaftem Umschütteln nach jeder Minute beläßt, erhält man in beiden Fällen alkalisch reagierende Lösungen. Die mit dem feinkörnigen Präparat hergestellte Lösung reagiert aber deutlicher alkalisch und sie gibt auf Zusatz von Salzsäure eine sehr reichliche Abscheidung, während die aus grobkörnigem Material bereitete Lösung dabei klar bleibt, wohl aber beim Einleiten von Schwefelwasserstoff eine deutliche flockige Abscheidung von Antimonsulfid gibt. Nach gründlichem Zerreiben des grobkörnigen Materials verhält sich dieses beim Auflösen (nach qualitativer Beurteilung) ebenso wie das mehlige Präparat.

Die Menge des in Lösung gegangenen Salzes läßt sich auch nach dem Leitvermögen beurteilen — eine Lösung mit einem spezifischen Leitvermögen von der Größenordnung 0,01 reziproke Ohm kann als ziemlich konzentriert betrachtet werden. Im übrigen kann durch das Verhalten einer Lösung gegen 2/1 norm. Salzsäure, beziehungsweise Schwefelwasserstoff rasch Aufschluß über die ungefähre Konzentration einer Lösung an Antimonat gewonnen werden.

Der verschiedenen Konzentration entsprechend treten die Fällungen bei makrochemischer Ausführung der Reaktion nach sehr verschiedenen Zeiten auf. Z. B. trat mit der konzentrierten, aus feinkörnigem Material bereiteten Lösung mit einer 0,01 norm. Lösung von Natriumnitrat beim Vermischen gleicher Volume bereits nach fünf Minuten eine kristallinische Abscheidung ein, mit der verdünnteren Lösung dagegen erst nach sechs Stunden. Ob dies nur mit einer Verschiedenheit der Konzentration oder nicht

vielleicht auch mit einem verschiedenen Zustande der „Aggregation“ nach G. Jander und W. Brüll[2]) zusammenhängt, muß zunächst dahingestellt bleiben.

Mit Bezug auf den Einfluß der verschiedenen Konzentrationen des Reagens bei mikrochemischer Ausführung sei noch bemerkt, daß selbst mit Lösungen von so verschiedener Konzentration (daß die eine auf Zusatz von 2/1 norm. Salzsäure eine sehr reichliche Abscheidung gibt, die andere keine — siehe oben) zufriedenstellende Ergebnisse erhalten werden. Allerdings ist die Mannigfaltigkeit der Formen des Na-Antimonats bei Anwendung einer konzentrierteren Lösung größer, so daß die Verwendung einer verdünnteren Lösung in dieser Hinsicht einen Vorteil bietet. Mit einer konzentrierteren Lösung kommt man allerdings in dem Falle etwas weiter, wenn man nicht von einem festen Rückstande, sondern von einer Lösung ausgeht. Es zeigt sich dann, daß die Entstehung einer Kristallisation eher ausbleibt, wenn man eine verdünntere Lösung als Reagens angewendet hat. Es kann natürlich dann immer versucht werden, ob eine Kristallisation eintritt, wenn man den Objektträger einige Minuten auf dem Wasserbade erwärmt.

Zur Herstellung einer für die mikrochemische Prüfung geeigneten Lösung verfahren wir so, daß eine kleine Menge (etwa 0,05 g) mit 5 ccm Wasser einige (zwei bis drei) Minuten unter häufigem Schütteln auf etwa 50° erwärmt wird, wenn das Präparat von mehliger Beschaffenheit ist. Dabei gehen die feinsten Teilchen alsbald in Lösung, die gröberen setzen sich leicht ab, so daß auf Filtration verzichtet werden kann. Bei grobkörnigem Material wird einige Minuten bis zu schwachem Sieden erhitzt und die Lösung unter der Wasserleitung auf Zimmertemperatur abgekühlt. Eine auf die eine oder andere Weise bereitete Lösung gibt mit Salzsäure eine deutliche Trübung. Gegenüber Lackmuspapier zeigen die Lösungen ganz schwach alkalische oder neutrale Reaktion; es hängt dies von der Menge des Präparats im Verhältnis zur Menge des Lösungsmittels ab.

Ich würde es nicht wagen, einen so schlichten Beitrag zum Pregl-Jubiläumsband beizusteuern, wenn ich nicht glaubte erwarten zu dürfen, daß dem Jubilar gerade durch dieses Beispiel eine kleine Geburtstagsfreude bereitet werden würde, durch welches

[2]) G. Jander u. W. Brüll, Zeitschr. f. anorg. Chem. *158*, 334 (1926).

die Überlegenheit der mikrochemischen Ausführung einer Reaktion in so überzeugender Weise dargelegt werden kann.

Herrn Dr. PIATER möchte ich auch an dieser Stelle aufs beste für die Versuche danken, die er unter anderem über die Auflösungsgeschwindigkeit des K-Antimonats durchgeführt hat und die hier nur zum Teil Erwähnung gefunden haben. — Die Mikroaufnahmen, die ich Herrn Dr. F. LÜHR verdanke, sind mit einem Mikroskop und einer Mikrokamera von der Firma Busch aufgenommen worden, für deren Überlassung ich der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft zu besonderem Danke verpflichtet bin.

Die Bedeutung der Mikrochemie in der forensischen Praxis.

Mikrochemischer Nachweis der Verteilung des Quecksilbers in den verschiedenen Körperteilen bei Vergiftungen.

Von **J. Buchtala.**

(Aus dem Institut für medizinische Chemie, Bratislava.)

(Eingelangt am 2. Juli 1929.)

Fast jeder Chemiker, der vom Gericht mit der Funktion eines Sachverständigen betraut ist, kommt bei Ausübung dieser Tätigkeit öfter in die Lage, für seine Untersuchungen entweder nur geringe Mengen des zu analysierenden Stoffes zugeteilt zu erhalten, oder wenn schon eine größere Menge von Untersuchungsmaterial zur Verfügung gestellt wird, ist in demselben die in Frage stehende Substanz meist nur in äußerst geringer Menge, oft sogar nur mehr in Spuren vorhanden.

Bei der immer ausgedehnteren Verwendung anorganischer und organischer Giftstoffe auch für therapeutische Zwecke ergibt sich die dringende Notwendigkeit, das Schicksal der verschiedenen Stoffe im Körper zu verfolgen und zu erkennen. Es genügt nicht, ein oder das andere Gift im Körper überhaupt nur nachzuweisen, sondern für die Beurteilung einer Vergiftung ist die Angabe über die dargereichte, respektive die gefundene Menge von wesentlicher Bedeutung. Für ein gedeihliches Wirken der Chemie im Dienste des Gerichtes wird daher auch ein inniger Kontakt des Chemikers mit dem Gerichtsarzte stets erforderlich sein, wenn schon die Vereinigung dieser beiden Funktionen in einer Person nicht möglich ist oder nur ganz selten vorkommen dürfte. Schon durch richtige und zweckentsprechende Entnahme und Verwahrung des zu untersuchenden Materials — wofür ja in vielen Staaten bereits Normen existieren — wird die Arbeit dem Chemiker nicht nur erleichtert, sondern oft überhaupt möglich gemacht. Es wäre daher gewiß im Interesse der forensischen Chemie, wenn auch bestimmte chemische Methoden, welche sich bereits gut bewährt haben, von Zeit zu Zeit entsprechend den Fortschritten der Chemie k o d i f i z i e r t würden, weil damit so mancher Widerspruch in den Befunden der ge-

richtlichen Experten beseitigt und das Vertrauen des Gerichtes und der Bevölkerung zur fachmännischen Tätigkeit der Gerichtsärzte und -chemiker gefestigt würde. Daß hierbei die Mikrochemie und ihre erprobten Methoden eine wichtige Rolle spielen werden, ist nicht nur allzu begreiflich, sondern auch geboten. Zur Begründung der eben gestellten Forderungen mögen einige praktische Beispiele dienen.

Grenzen der Nachweisbarkeit des Quecksilbers in Leichenteilen vergifteter Personen.

Das Quecksilber findet bei wissenschaftlichen Arbeiten, in der Technik, im Gewerbe und nicht zuletzt in der Heilkunde so vielerlei nützliche Verwendung, daß an seine schädlichen Eigenschaften oft gar nicht gedacht wird. Die Ansichten über die Giftigkeit kleinster Mengen dieses Metalles und seiner Verbindungen sind ebenso geteilt, wie die Ansichten über die Grenzen seiner Nachweisbarkeit in den menschlichen und tierischen Geweben. Während zum Beispiel A. SARTORI[1]) in einer Durchschnittsprobe eingesandter Organteile von einer vergifteten Leiche im Gewichte von 920 g kein Hg finden konnte und erst bei Verarbeitung von Teilen des Dickdarms, Dünndarms samt Inhalt sowie beider Nieren geringe Mengen einer Hg-Verbindung nachwies und bei weiteren Versuchen feststellte, daß nach dem von ihm angewandten LUDWIG'schen Verfahren im zerstörten Speisebrei noch 2 mg Sublimat deutlich nachweisbar waren, 1 mg jedoch nicht mehr, hatte Autor die Aufgabe, in einem eingesandten Material des Kreisgerichtes D. K., wobei die Gesamtmenge — Darm und Leber — 180 g betrug, eine Vergiftung nachzuweisen. Nach negativem Ausfall der Untersuchung auf organische Gifte wurden die Reste von dieser Untersuchung (im Gewichte von 100 g) nach der Methode von BABO-FRESENIUS zerstört und ein Teil des gewonnenen klaren Filtrats der Elektroanalyse unterzogen in dem vom Verfasser bereits früher veröffentlichten Apparate[2]). An der Goldkathode schied sich ein Quecksilberbelag in einer Menge von 0,00007 g ab, der sowohl mikroskopisch als auch mikrochemisch in der Form des zuerst gelben, dann rot wer-

[1]) Über einen interessanten Fall von Sublimatvergiftung und die Grenze der Nachweisbarkeit von Quecksilbersalzen in Leichenteilen. Ch. Z. 1924, 33, 141.

[2]) H. BUCHTALA, Über das Verhalten des Quecksilbers usw. Neue Methode für den quantit. Nachweis des Quecksilbers usw. Zeitschr. f. ph. Ch. Bd. 83, S. 249.

denden Quecksilberjodids als solcher indentifiziert wurde. Es handelte sich in diesem Falle um die Vergiftung einer jungen Frau durch ihren Mann, die erst am fünften Tage der Vergiftung erlag, wobei der größte Teil des dargereichten Giftes den Körper bereits verlassen hatte. Von diesem mikrochemischen Befunde ausgehend, ergaben auch die weiteren gerichtlichen und chemischen Untersuchungen den Tatbestand der Vergiftung.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich abermals die vorteilhafte Anwendung des Kohlenstabes als Anode empfehlen, die durch eine geprüfte Tonzelle von der Gold- oder Platinkathode getrennt ist und wobei mit verschiedenen, auch beträchtlich hohen Stromstärken und -dichten gearbeitet werden kann und die Störungen durch die Entwicklung von Chlor beseitigt werden, was K. Fuchs[3]) bei der mikroelektrolytischen Bestimmung des Goldes aus salzsaurer Lösung durch Überschichten mit Toluol zu bewerkstelligen vorschlägt.

Verteilung des Quecksilbers in den verschiedenen Leichenorganen bei Vergiftungen.

Da für gerichtlich-chemische Untersuchungen von den obduzierenden Ärzten oft nur einzelne Organe und davon wiederum nur kleine Teile eingesandt werden, worauf dann bei positivem Nachweis eines Giftes in denselben die vermutliche Menge des resorbierten Giftes meist so berechnet wurde, daß die in den abgewogenen Leichenstücken gefundene Giftmenge mit einem dem Körpergewicht der Vergifteten entsprechenden Faktor multipliziert wurde, wobei eine gleichmäßige Verteilung des Giftes im Körper Voraussetzung war, erscheint es notwendig, die Verteilung der verschiedenen Gifte in den einzelnen Körperteilen festzustellen, damit die notwendigen Umrechnungen mit den allenfalls erforderlichen Korrekturen vorgenommen werden können. Eine Gelegenheit hierzu bot sich in einem Vergiftungsfalle mit Sublimat, der bei der Obduktion nicht erkannt wurde und von dem fast sämtliche Organe zur Untersuchung eingeschickt worden waren. Nachdem durch die chemische Untersuchung der Leichenteile eine Sublimatvergiftung festgestellt war, wurden die in den einzelnen Organen resorbierten

[3]) K. Fuchs, Wien, Mikroelektrolyt. Best. des Goldes, Mikrochemie, Jahrgang I, 1923, S. 86.

Quecksilbermengen bestimmt, wozu von jedem Organ je 50 g dienten.

Die aus den einzelnen Organen isolierten Quecksilbermengen waren folgende:

1.	Gehirn	0,00039 g
2.	Lunge	0,00146 „
3.	Herz	0,00681 „
4.	Magen	0,16160 „
5.	Duodenum	0,02464 „
6.	Dünndarm	0,01649 „
7.	Dickdarm	0,01011 „
8.	Niere	0,00696 „
9.	Leber	0,00145 „
10.	Milz	0,00370 „

Nachdem die auf den Goldblechkathoden niedergeschlagenen Quecksilbermengen gewogen waren (Dauer der Elektrolyse je drei Stunden bei 5 Volt und 0,5 Ampere), wurde das Quecksilber durch Erhitzen der Kathode in Glasprouvetten verdampft und nach Zusatz eines entsprechend großen Körnchens Jod als rotes Quecksilberjodid anschaulich gemacht. Die vorstehende Photographie zeigt das Resultat der Untersuchung, wie es noch nach drei Jahren als wohlerhaltenes und unverändertes corpus-delicti-Bild aufgenommen werden konnte. Die dunklen Streifen in dem sonst roten Belag stellen einen metallischen Quecksilberspiegel dar, der in der in-

zwischen abgelaufenen längeren Zeitdauer an Intensität kaum etwas eingebüßt hat.

Die durch Wägung gewonnenen und als Sublimate anschaulich gemachten Resultate zeigen, daß einzelne Körperteile das Quecksilber in beträchtlich größerer Menge festhalten, was bei der Berechnung der im ganzen Körper sich vorfindenden Giftmengen stark zu berücksichtigen ist.

Schließlich ist aus den gefundenen Mengen leicht ersichtlich und hat es Verfasser in anderen Fällen von Quecksilber-, aber auch Bleivergiftungen durchgeführt, daß nämlich für die quantitativen, und zwar sowohl absoluten wie auch vergleichenden Analysen schon Materialmengen von nur 10 g genügen, was z. B. bei Untersuchungen von Kindervergiftungen besonders wertvoll ist.

Eine Methode zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes kleiner Organstücke.

Von **Max de Crinis.**

(Aus der Univ.-Nervenklinik in Graz, Vorstand Prof. Dr. F. HARTMANN.)

(Eingelangt am 16. Juli 1929.)

Die Bestimmung des spezifischen Gewichtes von Organen hat ein besonderes Interesse gewonnen, seit die Frage der Quellung von Organgeweben und die Beziehungen von Organgewicht und Krankheitsprozeß neuerlich im Mittelpunkt wissenschaftlicher Erörterungen steht.

Die einfachste Methode, das spezifische Gewicht eines Organes zu bestimmen, ist wohl die Berechnung aus dem Gewichtsverlust, den das Organ in einer Flüssigkeit vom spezifischen Gewichte 1, das ist Wasser, durch den Auftrieb erleidet, der ja dem Gewichte der verdrängten Flüssigkeit vom Volumen des eintauchenden Körpers gleich ist. Aus dem Verhältnis von absolutem Gewicht eines Körpers zum Gewichte der gleich großen verdrängten Wassermenge (Gewichtsverlust im Wasserauftrieb) ergibt sich das spezifische Gewicht.

Bei Organen, die unter normalen Verhältnissen als homogen anzusehen sind, z. B. Leber, Lunge und andere, wird die Bestimmung mit größten Mengen (100 g und mehr) mit gewöhnlichen Waagen mit der Empfindlichkeit bis zu 0,1 g erfolgen können.

Bei Organen, die keine homogene Struktur haben, wird die Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Organs mit diesen Hilfsmitteln wohl in der Gesamtheit, nicht aber seiner verschiedenartigen Anteile möglich sein. So ließen die bisherigen spezifischen Gewichtsbestimmungen normale oder krankhafte Veränderungen z. B. am Gehirne wohl im allgemeinen ersehen, konnten jedoch Rinde, Mark, Stammganglien usw. allein nicht berücksichtigen; und doch werden die spezifischen Gewichtsbestimmungen der verschiedenen Hirngebiete und -anteile uns bei verschiedenen Krankheiten noch wertvolle Aufschlüsse geben können.

Mit dem Studium von Hirnschwellungserscheinungen beschäftigt, habe ich versucht, spezifische Gewichtsbestimmungen nicht nur des Gehirnes als solchen, sondern auch der Rinde und des Markes zu machen. Dies geht nur mit kleinen Mengen, zu welchem Zwecke ich die Torsionswaage nach HARTMANN und BRAUN (Frankfurt) be-

nützte. Dieses empfindliche Instrument erlaubt nur eine Höchstbelastung von 500 mg und ermöglicht eine Gewichtsbestimmung durch direkte Ablesung auf mg genau. Um kleine Organstücke an die Aufhängevorrichtung der Torsionswaage zu bringen, habe ich feine Silbernadeln von 3,5 cm Länge mit einer Öse zum Aufhängen und einer umgebogenen Spitze zum Aufspießen des Organs herstellen lassen. Das Gewicht der verwendeten Nadel wird einmal absolut, dann im Wasser hängend festgestellt (z. B. zu 28, beziehungsweise 24 mg gefunden) und bei der jeweiligen Wägung vom Gesamtgewicht in Abzug gebracht.

Der Vorgang der Bestimmung des spezifischen Gewichtes ist also kurz folgender: Die Silbernadel wird zunächst in der beschriebenen Weise abgewogen und hierauf ein zirka 200 bis 400 mg schweres Organstückchen auf die Silbernadel aufgespießt, an der Aufhängevorrichtung der Torsionswaage aufgehängt und das Gewicht bestimmt. Nach Abzug des schon bekannten Gewichtes der Silbernadel erhält man das Gewicht des Organstückes. Hierauf wird ein kleines Glasgefäß mit zirka 2 cm Lumen und 4 cm Höhe mit destilliertem Wasser gefüllt und auf eine Einlage, die in den rechtwinkelig abklappbaren Schutzdeckel der Aufhängevorrichtung gelegt wird, gebracht. In dieses Gefäß läßt man nun das Organ, das mit der Nadel frei beweglich an der Waage aufgehängt war, eintauchen, so daß es sich vollkommen unter dem Wasserspiegel befindet. Um Kapillaritätswirkungen zu vermeiden, ist es notwendig, daß das Organ während der Wägung den Wasserspiegel nicht berührt, sondern sich mindestens 2 bis 3 mm unter dem Wasserspiegel befindet. Nur dann wird die Waage sich ausschwingen können und eine richtige Ablesung ermöglichen. Das Gewicht des eingetauchten Organstückchens wird wieder notiert, das Gewicht der eingetauchten Nadel abgezogen und der Gewichtsverlust durch den Auftrieb aus der Differenz des Gewichtes vor dem Eintauchen und nach dem Eintauchen in Wasser berechnet.

Als praktisches Beispiel sei eine Berechnung des spezifischen Gewichtes als Beleg angeführt:

Gewicht eines Stückchen Gehirnmarkes nach Abzug des absoluten Nadelgewichtes (28 mg): 236 mg.

Gewicht dieses Stückchens im destillierten Wasser nach Abzug des Gewichtes der eingetauchten Nadel (24 mg): 12 mg.

Der Auftrieb ist also 236—12 = 224.

Das spezifische Gewicht 236 : 224 = 1,05.

La céruléo-molybdimétrie méthode de micro-dosage des ions phosphoriques et arséniques.

par **Georges Denigès.**

(Institut de Chimie biologique et médicale à l'Université de Bordeaux.)

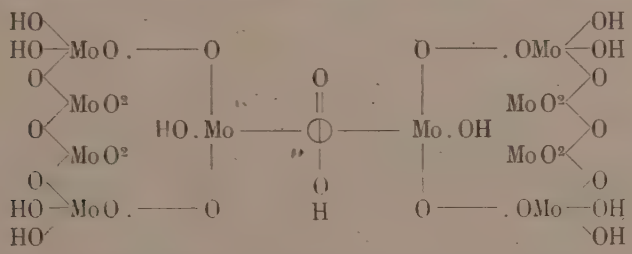
(Eingelangt am 26. April 1929.)

I. Préliminaires.

Nous avons désigné sous le nom de céruléo-molybdimétrie[1]) une méthode de détermination des ions phosphoriques et arséniques — même lors qu'ils sont en fort minime quantité — fondée sur la production très aisée de composés phospho et arsénio-molybdiques bleus (c œ r u l e u s, bleu) que nous avons isolés l'état de cristaux rhombiques, analysés, représentés par le complexe:

$$[4\,(MoO^3)\cdot MoO^2]^2 \Phi\, O^4H^3, 4\,H^2O$$

et pour lesquels nous avons proposé le schéma de structure:



Φ étant un des deux phosphoroïdes: phosphore ou arsenic.

Ces composés dont le poids moléculaire (1578 pour le dérivé phosphoré, 1670 pour celui de l'arsenic) est environ 50 fois plus considérable pour le premier, 22 fois plus pour le second que le poids du phosphore (31) on de l'arsenic (75) qu'ils renferment et dont l'intensité de teinte est fort grande, quand ils sont en solution, permettent, par suite, de déceler et de doser, par voie colorimétrique, les moindres traces d'ions phosphorique ou arsénique.

---

[1]) G. Deniges. C. R. Acad. des siences, 1920, t. 171, p. 802; 1928, t. 186, p. 1052 et Bulletin des travaux de la Soc. de Pharmacie de Bordeaux, 1927, t. III, p. 107; t. IV, p. 203 et 206; 1928, t. II, p. 49; t. III, p. 128; t. IV, p. 203.

Nous nous appesantirons presque exclusivement, dans ce mémoire, sur ce qui concerne le premier de ces ions dont la diffusion dans la nature et l'importance l'emportent de beaucoup sur ce qui a trait au second mais en établissant, tout d'abord, les différences fondamentales existant entre ce que nous apellerons: les bleus de molybdène stables et instables.

II. Bleus de molybdène stables et instables.

Suivant les conditions de température, de degré d'acidité et de composition du milieu, les solutions hydro-sulfuriques d'acide molybdique, soumises à l'action d'agents de réduction, prennent une coloration bleue ne correspondant pas, toujours, à la formation d'un même produit.

C'est ainsi que le réactif sulfo-molybdique dont nous avons, autrefois, indiqué la formule (solution à 10 p. 100 de molybdate d'ammonium, additionnée de son volume d'acide sulfurique concentré) et les applications[2]) — réactif que, pour simplifier, nous désignerons, dans ce qui va suivre, par les lettres S. M. — bleuit sous l'influence de la lumière solaire et d'un grand nombre de réducteurs: sels stanneux ou cuivreux, cuivre, mercure, étain, aluminium, zinc, hydroquinone, etc.

Cette coloration bleue a, pour caractère, de disparaître par dilution dès que la concentration de l'acide sulfurique du milieu s'abaisse au dessous de 25 p. 100, en volume, ou par addition de cet acide quand sa concentration dépasse 75 p. 100 et de s'atténuer par l'action de la chaleur, d'autant plus fortement pour une même température, qu'elle était initialement plus faible; elle reparait, d'ailleurs, par refroidissement et semble obéir à une loi d'équilibre.

On peut donc qualifier d'i n s t a b l e le produit bleu ainsi formé, et dont la nature reste encore indéterminée, car si la disparition de sa teinte, par dilution, pourrait faire songer à un bioxyde de molybdène anhydre, bleu, son atténuation par la chaleur ou l'addition d'un excès d'acide sulfurique est contraire à cette hypothèse.

Nous ajouterons qu'il a encore, comme caractère, de ne pas passer

[2]) G. Deniges, Bulletin de la Société chimique de Paris, 3e série t. III, p. 797 et Bulletin des travaux de la Société de Pharmacie de Bordeaux, 1893, p. 286.

dans l'éther quand on agite sa solution hydrosulfurique avec ce véhicule, mais sans s'insolubiliser sous son influence[3]).

Au contraire, en présence d'ions phosphoriques ou arséniques et dans d'autres conditions de concentration, ces mêmes solutions soumises à l'action des réducteurs précités, ou encore, même en l'absence de ces ions, les solutions neutres de molybdates alcalins traitées par le chlorure stanneux, prennent une teinte bleue permanente que ni la dilution, ni l'élévation de température ne détruisent ou n'atténuent et qui correspondent à la formation de composés bien déterminés pouvant, par suite de cette permanence, être appelés, à juste titre: bleus de molybdène stables.

Ces derniers sont de deux catégories: les uns étant solubles dans l'éther qui les enlève totalement à leur solution sulfurique, dès que cet acide atteint une concentration de 4 N[4]): ce sont les phospho et arsénio-conjugués plus haut signalés; un autre étant, au contraire, insoluble dans ce liquide qui ne l'emprunte jamais à ses solutions sulfuriques, quel que soit leur degré d'acidité, mais qui peut l'y insolubiliser, en le coagulant, sous forme d'un précipité bleu surnageant le liquide aqueux: c'est le bleu de molybdène proprement dit:

$$4\,MoO^3 \cdot MoO^2$$

En dehors des modes de formation connus pour ces divers bleus stables, il en est un autre qu'on réalise facilement et dont on peut déduire une formule avantageuse pour l'obtention de la réaction céruléo-molybdique relative à la recherche de traces de phosphore et d'arsenic.

Si, en effet, on dilue dans trois fois son volume d'eau le réactif sulfo-molybdique (S. M.) précédemment indiqué, ce qui fournit une solution contenant, pour $200^{c.c.}$: 2 gr. 50 de molybdate d'ammonium, $175^{c.c.}$ d'eau et $25^{c.c.}$ d'acide sulfurique, et si on l'additionne de l'un des réducteurs plus haut énumerés et en particulier de cuivre métallique, il se produit d'abord, même à froid, au bout d'un temps variable avec le réducteur, une coloration jaune rougeâtre, plus ou moins foncée, résultant de la formation,

[3]) Avec certains échantillons d'éther, abandonnés en vidange, la solution acide devient jaune d'or par suite de la production d'acide permolybdique provenant de l'eau oxygénée formée dans l'éther altéré.

[4]) Mais non à leur solution phosphorique ou acétique, même à ce degré de concentration.

au moins partielle, de bioxyde de molybdène salifié par l'acide sulfurique et qu'on peut insolubiliser par un excès d'ammoniaque, lorsqu'on emploie le cuivre, par exemple. Si l'on arrête, à ce point la réduction (qui va plus loin avec le zinc, l'aluminium, etc.), le liquide additionné d'une solution aqueuse, assez concentrée, d'un molybdate alcalin, se colore immédiatement en bleu et peut même précipiter un produit de même couleur.

Il se forme ainsi du bleu de molybdène proprement dit, stable et insoluble dans l'éther:

$$MoO^2 + 4\,MoO^3 = 4\,MoO^3 \cdot MoO^2$$

Par contre, si on l'additionne, non plus de molybdate mais d'ion phosphorique ou arsénique et si le milieu renferme encore de l'acide molybdique non réduit, la coloration bleue qui prend naissance, lentement à froid, rapidement à chaud, résulte de la formation des dérivés phospho ou arsénio-céruléo-molybdiques — extrêment stables — dont il a été question plus haut et ayant pris naissance, dans le cas de l'acide phosphorique par exemple, suivant la réaction:

$$2\,MoO^2 + 8\,MoO^3 + PO^4H^3 = [4(MoO^3)MoO^2]^2\,PO^4H^3.$$

III. Moyens divers pour réaliser la réaction céruléo-molybdique.

L'égalité précédente qui formule la réaction céruléo-molybdique dans le cas du phosphore et qui peut-être appliquée à l'arsenic en y remplaçant P par As, montre que cette réaction nécessite la présence simultanée des ions phosphoriques ou arséniques qu'elle sert à rechercher ou à doser et des éléments de l'acide molybdique et de son produit de réduction MoO^2.

Un milieu molybdoso-molybdique est donc nécessaire à sa production.

Or, ce milieu peut être réalisé soit extemporanément, dans le cours même de la réaction par réduction partielle d'acide molybdique; soit par addition, au liquide renfermant le phosphoroïde, d'un mélange de deux solutions séparées contenant l'une MoO^3, l'autre MoO^2.

Dans le premier cas, on peut avoir recours au chlorure stanneux ou au cuivre.

Avec le chlorure stanneux[5]), on met, dans un tube à essai, $5^{c.c.}$ de solution phosphorique (concentration: de Omg 2 à 20 mgs. de PO^4H^3 par litre) on ajoute III à IV gouttes de réactif S. M. (voir plus haut), I à II gouttes de réactif stanneux et on agite. Déjà, avec 1 milligramme de PO^4H^3 par litre, une coloration bleue très accusée est aussitôt obtenue; une très légère nuance bleutée est encore perceptible avec Vingt fois moins de substance phosphorée.

Quand les doses de PO^4H^3 mises en œuvre sont suffisamment importantes on continue à ajouter, goutte à goutte, le réactif stanneux jusqu'à ce que la coloration bleue n'augmente plus d'intensité.

Le chlorure stanneux réduit une partie de MoO^3 en MoO^2 et ce dernier, agissant à l'état naissant, en présence de MoO^3 excédant, provoque immédiatement, à froid, la réaction céruléo-molybdique.

Avec le cuivre en tournures — cas surtout à recommander en présence du ferricum qui gênerait la réaction et que Cu réduit[6]) en ferrosum inactif, et du mercure que MoO^2 réduirait à l'état colloïdal troublant ainsi la réaction cherchée mais que Cu fixe à l'état d'amalgame — on ajoute, toujours à $5^{c.c.}$ de solution phosphorique, XII gouttes de réactif S. M. préalablement étendu au quart ou III gouttes seulement de réactif en nature; 10 à 15 centigrammes[7]) de tournures de cuivre et on porte à l'ébullition qu'on maintient pendant 30 secondes pour obtenir la teinte bleue caractéristique. Ce temps et cette température sont nécessaires pour que l'action réductrice du cuivre, sur une partie de l'acide molybdique, ait lieu dans les meilleures conditions.

Dans le second cas, on bien on prépare à l'avance le réactif

---

[5]) Préparé en dissolvant, à chaud, 0 gr. 10 d'étain, en feuille, dans un mélange de $2^{c.c.}$ de Cl H pur et d'une goutte de solution de sulfate de cuivre à 3 on 4, p. 100; ajoutant, ensuite, $10^{c.c.}$ d'eau, laissant refroidir et déposer puis décantant ou filtrant, s'il y a lieu.

[6]) Cette réduction est d'ordre catalytique: en effet, Cu ne réduit pas directement Fe‴ en Fe″ mais transforme d'abord MoO^3 en MoO^2 qui reduit immédiatement Fe‴ en Fe″ en revenant à l'état de MoO^3, ce cycle se poursuivant tant qu'il y a du ferricum à réduire

[7]) Cette quantité doit s'abaisser à 5 ou 6 centigrammes, en présence de mercure. Quand elle dépasse 8 centigrammes, la fixation de ce métal à l'état d'amalgame — lorsqu'il est en trop grand excès — se fait incomplétement et, au lieu de laisser le milieu limpide, comme, quand il est complétement retenu par le cuivre, le mercure, trop rapidement libéré, se repand, en partie dans le liquide, à l'état colloïdal et empêche une bonne observation colorimétrique.

molybdoso-molybdique en agitant, à plusieurs reprises (une dizaine de fois environ) pendant une heure exactement, de contact, et entre 18 et 20 degrés, un mélange de 15$^{c.c.}$ de réactif S. M. dilué au quart et de 0 gr. 30 de tournures de cuivre, le tout contenu dans un petit flacon d'une vingtaine de grammes, se bouchant à l'émeri.

Au bout du temps prescrit, on décante, dans un autre petit flacon, le liquide devenu jaune brunâtre et qui constitue le réactif cherché.

On l'emploie à la dose de VI gouttes pour 5 $^{c.c.}$ de solution phosphorique (ou arsénique) et on porte le tout à l'ébullition, pendant une douzaine de secondes, pour obtenir la réaction céruléo-molybdique. Ce réactif doit être renouvelé toutes les semaines.

On bien — et cette pratique a l'avantage de fournir des réactifs d'une conservation très longue — on commence à réduire complétement une certaine quantité (30$^{c.c.}$ par exemple) de réactif S. M. dilué au quart, en le laissant en contact avec 0 gr. 50 à 0 gr. 60 de tournures de cuivre.

Au bout de quelques heures, durant lesquelles on aura agité plusieurs fois le liquide et le métal contenus dans un flacon presque plein, le liquide molybdeux, jaune-brunâtre — un des éléments du réactif complet — est prêt. On le conservera, sans le décanter, en le laissant constamment avec le cuivre résiduel.

Pour l'emploi, on en met III gouttes par essai de 5$^{c.c.}$ et on ajoute, au mélange, VI à VII gouttes de réactif S. M. étendu au quart (second élément du réactif molybdoso-molybdique).

L'ébullition du mélange est prolongée, comme il est indiqué plus haut, durant une douzaine de secondes pour réaliser la réaction cherchée.

IV. Préparation des étalons colorimétriques.

1° On prépare, à l'avance, 100$^{c.c.}$ de solutions aqueuses de phosphate disodique contenant des doses de ce sel correspondant à 2, 4, 6, 8, 10 et 12 milligrammes de P^2O^5 par litre et obtenues en diluant, convenablement, une solution mère renfermant, par litre, 5 gr. 042 de phosphate disodique pur et non effleuri, ce qui correspond, pour ce même volume d'un litre, à 1 gramme d'anhydride phosphorique P^2O^5.

Toutes ces solutions phosphoriques, aussi bien les liqueurs mères que les dilutions, seront conservées à l'abri des moisissure

— dans leur flacon respectif dûment étiqueté — par addition d'un petit fragment de camphre[8]).

On choisit, ensuite six tubes de verre le plus blancs et le plus semblables possible, d'environ 15 à 16 millimètres de diamètre intérieur, par exemple, et dans lesquels un même volume d'eau s'élèvera à la même hauteur.

On les marque avec une toute petite étiquette portant, respectivement, les chiffres: 2, 4, 6, 8, 10 et 12.

Ils sont destinés à recevoir les liquides colorés étalons. Ces derniers s'obtiennent très rapidement et à froid, quand on emploie le chlorure stanneux comme réducteur du réactif S. M. en mettant, dans les six tubes, $5^{c.c.}$ des solutions phosphoriques titrées correspondant au numéro respectif de chacun de ces récipients et ajoutant du réactif S. M. et du chlorure stanneux selon les conditions indiquées au paragraphe III.

Quand on veut utiliser les autres techniques, dans un tube un peu plus important que les précédents (de 18 millimètres de diamètre intérieur avec 18 centimètres de hauteur) et choisi tel pour éviter les projections lors de l'ébullition des liquides qu'il devra contenir, on introduit d'abord $5^{c.c.}$ du liquide titré à 2 milligrammes de P^2O^5, par litre, puis soit VI gouttes de réactif molybdoso-molybdique, soit III gouttes de réactif molybdeux et VI gouttes de réactif S. M. dilué au quart, soit enfin XII gouttes de ce dernier réactif et une petite quantité de tournures de cuivre (de 5 à 20 centigrammes et plus suivant les cas — voir paragraphe III).

On porte à l'ébullition en agitant constamment le liquide, le tube étant tenu avec une pince de bois.

Ce point obtenu et sans cesser de brasser[9]), en quelque sorte, le liquide, en secouant de haut en bas, un peu obliquement et d'une manière constante, le récipient qui le contient, on continue l'ébullition dans l'air chaud surmontant la flamme, durant à peu

[8]) Avec les liquides titrés précédents, dilués au dixième, on réalise des solutions à 2, 4, 6, 8, 10 et 12 dixièmes de milligramme de P^2O^5, par litre. Ces dernières servent, surtout pour le titrage de liquides extrêmement peu concentrés en ions PO^4 tels que les eaux potables pour lesquelles l'emploi du chlorure stanneux est à recommander.

[9]) Ce brassage et cette agitation sont essentiels à la constance de l'opération. Toute autre technique, en particulier celle du chauffage des liquides, à l'aide du bain-marie, ne fournit que des résultats beaucoup moins fidèles.

près une douzaine de secondes — en l'absence de cuivre métal — en comptant 1, 2, 3, etc. jusqu'à 12, à la cadence approchée de la seconde sexagésimale. Avec le cuivre en tournures, on prolonge l'ébullition pendant 30 secondes. Cela fait, on verse le liquide, devenu bleu, dans le tube étalon marqué du chiffre 2 et en outre, d'un trait à l'encre correspondant, depuis le fond, à un volume de $5^{c.c.}$. Quand ce liquide est devenu froid, on ajoute suffisamment d'eau pour que son niveau supérieur atteigne le trait de jauge de $5^{c.c.}$.

On opère de même avec les solutions à 4, 6, 8, 10 et 12 milligrammes de P^2O^5, par litre. Finalement, les six tubes étalons contenant chacun $5^{c.c.}$ de liquides bleus de teintes croissant, du N°. 2 au N°. 12, d'une manière très régulière et qu'on distingue fort aisément les unes des autres soit directement, soit plus facilement encore au bloc de Walpole, sont bouchés et gardés pour les comparaisons ultérieures. Si l'on a soin de les additionner d'un petit fragment de cuivre en tournures, ces étalons se conservent pendant plus d'un mois sans que leur couleur initiale change d'une manière sensible.

V. Applications céruléo-molybdimétriques au cas du Phosphore.

Micro-dosage extemporané de l'ion phosphorique. 1° Dans les vins et les autres boissons fermentées.

La détermination quantitative de l'ion phosphorique dans les vins, malgré l'intérêt qu'elle peut présenter: identification d'échantillons; repérages de vins d'un cru donné, suivant les années de récolte; falsifications, par addition d'acide phosphorique, pour hausser la somme acide-alcool; addition de phosphate de chaux à la cuve avant ou après vinification, etc., n'est pas de pratique courante.

La raison en est dans la lenteur, la minutie, en un mot la difficulté relative de cette opération par les méthodes ordinaires qui, toutes, nécessitent l'emploi d'un volume assez considérable de liquide et la destruction préalable de sa matière organique. La céruléo-molybdimitrie permet de résoudre cette question en quelques minutes, en opérant directement sur le vin et en n'employant pas plus de 2 à 3 gouttes de ce liquide, par opération.

Mode opératoire.

a. Cas des vins blancs. — Avec une pipette très exactement calibrée à $1^{c.c.}$, on prélève $1^{c.c.}$ de vin qu'on introduit dans un matras jaugé de $50^{c.c.}$ et on achève de remplir ce récipient, jusqu'au trait de jauge, avec de l'eau qui peut être de l'eau commune à la condition que cette dernière renferme moins d'un dixième de milligramme de P^2O^5 par litre, ce qui est la règle pour les bonnes eaux potables, mais ce dont on devra s'assurer par un essai direct.

Le vin, ainsi dilué au cinquantième, étant rendu homogène par agitation, on en prélève $5^{c.c.}$ qu'on introduit dans le tube qui a servi à préparer les étalons, on leur ajoute VI gouttes de réactif molybdoso-molybdique[10]), ou III gouttes de réactif molybdeux et VI gouttes de réactif S. M. dilué au quart, et on porte à l'ébullition dans les conditions opératoires indiquées précédemment.

Cela fait et après, refroidissement, on décante de liquide, devenu bleu, dans un tube de même calibre et de même verre que les tubes étalons, on en complète, s'il y a lieu, le volume à $5^{c.c.}$ et on compare l'intensité de sa teinte à celle des tubes étalons eux-mêmes. Si, par exemple, cette teinte s'identifie à celle du contenu du tube 6, on dit que le vin essayé renferme:

$$6 \text{ mgr.} \times 50 = 0 \text{ gr. } 30 \text{ de } P^2O^5, \text{ par litre.}$$

Si cette teinte est comprise entre celle des tubes 8 et 10 mais plus près de ce dernier, on en conclura que le vin renferme:

$$9 \text{ mgr. } 5 \times 50 = 0 \text{ gr. } 47 \text{ de } P^2O^5, \text{ par litre}$$

à 1 centigramme près, environ.

En d'autres termes, le poids de P^2O^5, existant dans 1 litre du vin essayé, est donné en multipliant par 0 gr. 05 le numéro réel — ou calculé[11]) quand la teinte est intermédiaire entre celle du contenu de deux tubes successifs marqués — du tube étalon dont le liquide a une intensité de teinte se rapprochant le plus de celle qu'aura fournie le vin dilué.

Lorsque la teinte obtenue dépasse celle de l'étalon 12, ce qui

[10]) Quand le réactif est préparé depuis plusieurs jours, on augmente le nombre de gouttes, à ajouter, d'une goutte tous les deux ou trois jours pour compenser sa diminution de titre en molybdène réduit, provenant de l'oxydation spontanée qu'il a pu subir.

[11]) C'est ainsi que, dans l'exemple choisi, le numéro calculé est 9,5 qui se rapproche plus de la valeur 10 que la moyenne $(10 + 8 : 2 = 9)$ des deux numéros successifs marqués 8 et 10.

est assez rare, on étend à moitié le liquide représentant déjà la dilution au cinquantième; on traite à l'ébullition, comme il a été indiqué, $5^{c.c.}$ de cette nouvelle dilution additionnés, suivant la technique ordinaire, des réactifs précités et, après comparaison chromoscopique, on calcule comme précédemment, mais en doublant les résultats obtenus.

b. Cas des vins rouges. — On opère absolument comme avec les vins blancs mais en tenant compte que ces liquides, même dilués, conservent toujours une teinte plus ou moins rosée qui s'exalte vers le rose vif quand ils sont acidulés, comme c'est le cas par addition des réactifs molybdiques.

Dans ces conditions, cette teinte rosée se superpose à la teinte bleue, fournie par les phosphates, pour donner un coloration violacée qui n'est plus, immédiatement, comparable à celle des étalons.

On tourne, avec la plus grande facilité, ce petit inconvénient apparent, en plaçant devant ou derrière les étalons, au bloc de Walpole, un tube de verre identique à ceux-ci et dans lequel on aura mis 8 à $10^{c.c.}$ de la dilution vineuse additionés d'une goutte d'acide sulfurique étendu au dixième. Devant ou derrière le tube contenant l'essai à comparer , on mettra un autre tube renfermant seulement de l'eau.

La teinte parasite est, ainsi, compensée à merveille et n'affecte, en rien, la rigueur des dosages.

Cette technique, rigoureusement suivie, fournit, dans un temps extrêmement court, des résultats d'une constance surprenante. Elle ne nécessite pas d'adaptation spéciale et permet, en outre, de mener rapidement, en série, un nombre important de déterminations de phosphates, dans le vins.

Les exemples suivants donneront une idée de la constance de la méthode: Un vin rouge de la région de Léognan (en Gironde), d'authenticité certaine, a été examiné à l'aide de cette méthode par quatre opérateurs différents dont chacun a trouvé 0 gr. 32 d'ion phosphorique, par litre de liquide.

$1^{c.c.}$ du même vin, dilué à $50^{c.c.}$ avec de l'eau, après incorporation, dans la dilution, de 1 gramme soit de sucre ordinaire, soit de sucre interverti, de $1^{c.c.}$ d'alcool absolu, de 0 gr. 10 d'acide tartrique et de 1 gramme de glycérine — ce qui correspond à des doses décuples pour les trois premiers de ce corps, et centuples pour le dernier, de celles qu'on trouve pour les constituants

massifs, habituels, des vins, même les plus sucrés — a fourni, encore, 0 gr. 32 d'ion phosphorique, par litre.

Dans un essai identique mais où le même vin avait été additioné de 0 gr. 18 d'ion phosphorique, par litre, on a retrouvé 0 gr. 50 de cet ion, ce qui correspond bien à la quantité calculée:

$$0 \text{ gr. } 32 + 0 \text{ gr. } 18 = 0 \text{ gr. } 50.$$

Ces chiffres montrent, indiscutablement, que les constituants ordinaires du vin, même ajoutés à des doses énormes, sont sans influence sur la rigueur des dosages, par céruléo-molybdimétrie, pratiqués suivant la technique plus haut indiquée.

On doit en déduire qu'aux proportions où ils existent dans les vins, ils ne peuvent amener aucune perturbation, à la base même de l'opération et que les chiffres trouvés représentent bien le phosphore m i n é r a l des vins.

On peut même dire que ce procédé est, actuellement, le seul pouvant-donner ce phosphore minéral, tous les autres nécessitant la destruction préalable des matériaux organiques laquelle entraîne la minéralisation fatale du phosphore organique qui se trouve constamment dans les vins sous forme de combinaisons éthérées: glycériques, hexosiques, inositiques ou autres et dont la présence, pour certaines au moins, est expliquée par les théories modernes sur le mécanisme de la fermentation alcoolique.

Mais il se prête, aussi, à la détermination exacte et très rapide du phosphore total — d'ou l'on peut déduire le phosphore organique — en opérant comme suit:

$1^{c.c.}$ de vin est évaporé dans une capsule de platine à fond rond (on peut, également, se servir d'un récipient en quartz ou en porcelaine) jusqu'à formation d'extrait presque sec. Au résidu, on ajoute X gouttes d'acide azotique; on évapore de nouveau et dessèche jusqu'à forte carbonisation. On ajoute encore V gouttes d'acide azotique; enfin, on évapore et calcine, jusqu'à obtention de cendres blanches.

On reprend, ensuite, par $20^{c.c.}$ d'eau qu'on additionne d'une goutte d'acide sulfurique pur, on porte à l'ébullition, on décante dans un matras jaugé de $50^{c.c.}$ et, avec de l'eau dont une partie aura servi à laver la capsule, on complète le volume, jusqu'au trait de jauge, après complet refroidissement.

Avec $5^{c.c.}$ de cette dilution on fait, comme plus haut, la détermination colorimétrique de P^2O^5.

Le vin rouge, pris précédemment comme exemple, a ainsi fourni 0 gr. 38 de phosphore total ce qui correspond à 0 gr. 38 — 0 gr. 32 = 0 gr. 06 de phosphore organique, également exprimé en P^2O^5.

Quand les vins rouges sont sucrés, on porte la première dose d'acide azotique à XX gouttes, la seconde à X, cette seconde addition se faisant lorsque, après dessiccation avancée et début de calcination, le résidu s'est fortement caramélisé.

Enfin, on fait une troisième addition de X gouttes du même acide, une fois la carbonisation obtenue et avant l'ultime calcination.

Le temps total de l'essai, dosage compris, ne dépasse pas dix minutes.

C'est en employant cette méthode que nous avons obtenu les résultats suivants sur des échantillons de vins d'une authenticité certaine.

VINS ROUGES

CRUS			Années	P^2O^5 minéral par litre
Saint-Emilion	Château	Ballan	1926	0 gr. 55
—	—	Bellevue	—	0 gr. 50
—	—	Peyreau	—	0 gr. 42
—	—	Mirbande	—	0 gr. 40
—	—	Rose	—	0 gr. 39
—	—	Guadet	—	0 gr. 30
—	—	Parsac	1927	0 gr. 38
—	—	Rabion	—	0 gr. 38
—	—	Puisseguin	—	0 gr. 30
Pomerol	—	Goupil	—	0 gr. 28
Saint-Julien	—	Gruaud Laroze	1926	0 gr. 36
Pauillac	—	Mouton d'Armailhac	—	0 gr. 40
Magau	—	Carrière	1927	0 gr. 45
—	—	Cusseau	—	0 gr. 36
—	—	Fine Rose	—	0 gr. 35
Lugon-Fronsac	—	—	—	0 gr. 35
Arques-Fronsac	—	—	—	0 gr. 57
Belves	—	Beauvoir	1926	0 gr. 42
—	—	Puy Arnaud	1887	0 gr. 32
Cadaujac	Domaine de	Chantecrit	1887	0 gr. 42
—	—	—	1898	0 gr. 40
—	—	—	1924	0 gr. 42

VINS BLANCS

CRUS	Années	P^2O^5 minéral par litre
SAUTERNES Château Raymond Lafon	1920	0 gr. 55
— — Guiraud de Suduiraud . . .	—	0 gr. 58
SAINT-MAXANT — de Malagarre	—	0 gr. 25
CADAUJAC Domaine de Chantecrit	1922	0 gr. 30

La moyenne, calculée sur 30 vins rouges parmi lesquels se trouvaient tous ceux qui figurent sur le tableau ci-dessus a été de 0 gr. 38 de P^2O^5 minéral, par litre; le dosage colorimétrique, pratiqué sur leur mélange a fourni, exactement, le même chiffre.

c. Cas des autres boissons fermentées. — Les techniques qui viennent d'être indiquées, pour les vins, sont applicables aux moûts après filtration et à toutes les boissons fermentées (bières, cidres, poirés, vinaigres, etc.).

Dans le cas des vinaigres on peut ainsi, avec leur aide, se rendre compte, immédiatement, si le produit est d'origine vinaire, ou purement issu de l'acool; ou, encore, s'il a été préparé par dilution d'acide acétique.

Le rapport $\frac{\text{P organique}}{\text{P minéral}}$ si facile à établir par cette méthode, sera, en outre, susceptible d'apporter à l'œnologie un nouvel élément pour l'appréciation des fraudes possibles et même pour suivre l'évolution des fermentations, remédier, en certains cas, à l'insuffisance phosphatique des moûts pour le développement des levûres, etc. etc.

En un mot, la méthode céruléo-molybdimétrique permet de poursuivre, avec la plus grande aisance, une série de questions que l'insuffisance ou la difficulté des procédés connus, ne permettaient pas jusqu'ici d'aborder.

2° Dans les terres, les engrais et les minerais phosphatés.

a. Cas de l'ion phosporique soluble dans l'eau. — 5 grammes de terre — préparée suivant les procédés classiques d'échantillonnage — sont mis dans un flacon d'environ 100 c.c. et additionnés de 50 c.c. d'eau. On bouche, agite à plusieurs reprises pendant un quart d'heure et on filtre.

5$^{c.c.}$ du filtrat tout additionnés du réactif molybdoso-molybdique, préalablement préparé ou formé extemporanément dans le liquide (voir plus haut, dans le cas des vins) et portés à l'ébullition qu'on maintiendra 12 secondes. On compare, ensuite, la teinte bleue obtenue à celle d'étalons préparés d'une façon semblable avec des liquides renfermant de 2 à 12 milligrammes de P^2O^5, par litre.

Si la teinte correspond à celle de l'étalon à n milligrammes par litre, la teneur, en P^2O^5, du kilogramme de terre sera de n centigrammes. Si cette teinte dépasse celle de l'étalon 12, on dilue le liquide de macération de la terre et on calcule en conséquence; si elle n'atteint pas celle de l'étalon 2, on la compare à une seconde échelle d'étalons allant de 0 mgr. 4 à 2 mgr. par litre.

Enfin, si le produit de macération de la terre est coloré, on en additionne 10$^{c.c.}$ d'une goutte d'acide sulfurique. Le mélange, mis dans un tube, est juste porté à l'ébullition et, au moment de la comparaison chromométrique, placé au bloc de Walpole devant les tubes étalons que l'on compare au contenu du tube renfermant l'essai.

b. Cas de l'ion phosphorique soluble dans les acides. — Pour la détermination de l'ion phosphorique soluble dans les acides dilués (minéraux ou organiques) et dont la quantité l'emporte, généralement, de beaucoup sur celle de l'acide phosphorique soluble dans l'eau, il faut procéder, d'emblée, à des dilutions plus grandes.

Ainsi, lorsque le dissolvant choisi est l'eau azotique à 2 p. 100, on commence à traiter 5 grammes de terre par 50$^{c\,c.}$ de dissolvant (ou plus si la terre est très calcaire). L'effervescence finie, on filtre.

Lorsque le titre initial du liquide de dissolution ne dépasse pas 2 p. 100 d'acide nitrique, on peut, après dilution au vingtième d'une partie du filtrat, opérer directement le dosage colorimétrique mais en faisant intervenir un tiers de plus, environ, du réactif.

Si ce titre est supérieur à 2 p. 100, ou si l'on se sert d'eau régale (détermination de P^2O^5 total) on évapore à sec, puis calcine 1$^{c\,c.}$ du filtrat. On reprend par 10$^{c\,c.}$ d'eau bouillante acidulée d'une goutte d'acide sulfurique.

C'est ainsi qu'on opérera lorsque l'acide citrique sera l'agent de dissolution, la calcination devant, alors, être précédée d'addition de quelques gouttes d'acide nitrique pour favoriser la combustion complète.

Quand la terre est ferrugineuse mais n'abandonne pas, au dissolvant, plus de 1 à 2 p. 100 de son poids de fer, on peut opérer comme précédemment mais en doublant la dose de réactif molybdoso-molybdique employé à chaque essai.

Si le ferricum est abondant, il faut le réduire. Le seul moyen pratique que nous ayons trouvé pour cela — toute autre tentative ayant échoué — a été d'effectuer l'essai colorimétrique final avec le réactif S. M. au quart, en en faisant intervenir X gouttes par essai de $5^{c.c.}$ et pratiquant l'ébullition en présence de 15 à 20 centigrammes de tournures de cuivre. Le réactif molybdoso-molybdique se forme, ainsi, extemporanément, réduit le ferricum, repasse à l'état molybdique, puis de nouveau à la forme réduite, grâce à l'excès de cuivre et, lorsque la réduction de $Fe^{\cdots}$ en $Fe^{\cdot\cdot}$ est complète — ce dont on s'aperçoit à la teinte bleutée que prend le mélange — fournit, si l'ébullition est maintenue encore 30 secondes, la même coloration (le volume final étant amené à $5^{c.c.}$) qu'on aurait obtenue avec le réactif molybdoso-molybdique lui même, en l'absence de fer.

Les résultats sont excellents, même en présence de 50 p. 100 de fer, surtout si l'on a soin de comparer, les teintes obtenues, avec une gamme d'étalons préparés avec le cuivre, dans les mêmes conditions, et d'opérer assez vite, la présence des sels de fer, dans le milieu, favorisant l'auto-oxydation du phospho-conjugué bleu.

Pour les engrais, la détermination de l'ion phosphorique sera effectuée par des techniques analogues avec cette seule différence que, lorsqu'il s'agira d'engrais phosphatés, les dilutions vu les fortes teneurs en cet ion, devront être beaucoup plus considérables que dans le cas des terres.

Il en sera, a fortiori, de même, pour les minerais phosphatés.

Dans ces conditions, les substances ambiantes, ne gênent plus le dosage direct.

3° Dans les produits de l'organisme.

a. Cas des urines. — La méthode classique et clinique de dosage de l'ion phosphorique urinaire, par les sels d'uranyle, n'est pas toujours d'une application aisée avec les urines fortement colorées soit par des pigments d'ordre pathologique (bile, urobiline, hémoglobine, etc.), soit par des dérivés d'origine médicamenteuse (bleu de méthylène, cryogénine, etc.). De plus, elle est

souvent entachée d'erreur dans le cas des albuminuries plus ou moins massives.

La céruléo-molybdimétrie permet de pratiquer ce dosage non seulement avec une extrême célérité mais dans des conditions où le procédé uranique est inapplicable ou, tout au moins, douteux dans ses résultats. En outre, comme il ne nécessite, pour être mis en œuvre, que des quantités infimes de liquide urinaire (une demi-goutte normale, c'est à dire $0^{c.c.}$ 025 pour un essai) elle est applicable dans des cas où la dose d'urine dont on dispose — par exemple chez les tout jeunes enfants, les animaux de petite taille, etc. — rend impossible l'utilisation de tout autre procédé de dosage. Elle est, enfin, un précieux et rapide mode de contrôle du procédé classique et, à ce dernier point de vue, mérite son usage systématique en urologie où la détermination du rapport $\frac{P^2O^5}{\text{Urée}}$, toujours utile, s'impose, particulièrement, dans les cas d'albuminuire, pour dépister une rétention possible d'urée.

Pratique du dosage. Avec une pipette, très exactement calibrée $1^{c.c.}$, on prélève $1^{c.c.}$ d'urine qu'on introduit dans un matras jaugé de $200^{c.c.}$ et on achève de remplir ce récipient, jusq'au trait de jauge, avec de l'eau commune exempte de phosphates.

L'urine, ainsi diluée au deux-centième, étant rendue homogène par agitation, on en prélève $5^{c.c.}$ qu'on traite par les réactifs molybdoso-molybdiques comme les vins et on les compare à des étalons (renfermant de 2 à 12 milligrammes de P^2O^5 par litre) traités dans les mêmes conditions. Si la teinte obtenue correspond, par exemple, à l'étalon à 6 mgr. par litre, l'urine examinée renferme 6 mgr. $\times$ 200 = 1 gr. 20 de P^2O^5, par litre.

Lorsque la teinte de l'essai dépasse celle de l'étalon 12 on étend à moitie le liquide représentant déja la dilution au deux-centième; enfin lorsqu'elle n'atteint pas celle de l'étalon 6, on fait une seconde opération sur $5^{c.c.}$ d'urine diluée seulement au centième. Dans les deux cas, on calcule en conséquence.

Quand la dilution — quoique fort grande — de l'urine employée, donne encore un liquide sensiblement coloré — ce qui est exceptionnel — on compense cette teinte parasite en mettant au bloc de Walpole, devant ou derrière les étalons, un tube de verre renfermant une dizaine de centimètres cubes de cette dilution.

Enfin, si l'urine examinée renferme plus d'un gramme d'albumine, par litre, on ajoute au centimètre cube de cette urine, mis dans un matras jaugé de 200$^{c.c.}$, une dizaine de centimètres cubes d'eau, II gouttes d'acide acétique cristallisable, de V à X gouttes de réactif de Tanret (iodure mercurico-potassique acétique), suivant le quantité d'albumine, on porte juste à l'ébullition, on complète à 200$^{c.c.}$ avec de l'eau. Après refroidissement, on filtre et on opère comme plus haut sur 5$^{c.c.}$ du liquide filtré.

c. Cas du sang. — Dans une éprouvette, jaugée à 25$^{c.c.}$, on introduit 1$^{c.c.}$ de sang on de sérum sanguin; on ajoute le double de ce volume soit 2$^{c.c.}$ d'iodure mercurico-potassique [réactif de Tanret][12]); on agite pour mélanger, on complète à 25$^{c.c.}$ avec de l'eau, on mélange encore et on filtre.

5$^{c.c.}$ du filtrat sont mis dans un tube à essai puis additionnés de X gouttes du réactif S. M. dilué au quart et de 5 à 6 centigrammes de cuivre, en tournures.

Avec un trait d'encre, on marque, sur le tube, le point le plus déclive du ménisque inférieur du liquide qu'on porte, ensuite, à l'ébullition. Celle-ci, une fois obtenue, est maintenue pendant 30 secondes, en agitant constamment le tube.

On laisse refroidir, on ajoute, goutte à goutte, suffisamment d'eau pour rétablir le volume primitif dans la mesure où il a été diminué par l'ébullition, et on verse le lequide résultant dans le tube destiné à la comparaison colorimétrique avec les étalons.

Si le liquide du tube contenant l'essai a une teinte identique à celle du liquide étalon à n mgs. de P^2O^5 par litre, c'est que le sang ou le sérum sanguin essayés — dont la dilution est 1 : 25 — contiennent 25 fois plus de P^2O^5, soit:

n fois 25 milligrammes, par litre.

Cet essai peut-être effectué avec 0$^{c.c.}$ 4 seulement de sang ou de sérum sanguin et 0$^{c.c.}$ 8 de réactif de Tanret, mélange qu'on étend, cette fois, à 10$^{c.c.}$ seulement, avec de l'eau, pour maintenir la même concentration que dans le cas précédent.

Après filtration, on opère sur 5$^{c.c.}$, ainsi qu'il a été dit plus haut. Enfin, si l'on ne disposait que de quantités de sang plus réduites

[12]) Voici la formule de ce réactif tel que nous l'employons: Mettre, dans un matras jaugé de 200$^{c.c.}$, 2 gr. 71 de bichlorure de mercure finement pulvérisé, 10$^{c.c.}$ d'eau distillée et 7 gr. 20 d iodure de potassium. Agiter jusqu'à dissolution et compléter le volume à 200$^{c.c.}$ avec de l'eau. Mélanger, ensuite, le liquide résultant, avec 40$^{c.c.}$ d'acide acétique cristallisable...

— 1 goutte, soit $0^{c.c.}$ 05, par exemple — on pourrait, encore, en déterminer la teneur en P^2O^5, en la mélangeant à II gouttes ($0^{c.c.}$ 1) de réactif de Tanret, étendant à $7^{c.c.}$ 5 avec de l'eau, filtrant et opérant toujours avec $5^{c.c.}$ de filtrat, mais en comparant, cette fois, la teinte obtenue, avec celle d'étalons de teneur en P^2O^5 six fois plus faible que dans les cas précédents, c'est à dire à 1, 2, 4, 6 et 8 sixièmes de milligramme de ce produit, par litre. Les calculs restent les mêmes[13]).

c. Cas du liquide céphalo-rachidieu. — On opère comme dans le cas du sang mais avec quatre gouttes seulement de réactif de Tanret.

d. Cas des laits. — Quand le lait à examiner est riche en protides, comme celui de vache par exemple, on en met $1^{c.c.}$ dans un matras jaugé de $100^{c.c.}$, on ajoute II gouttes d'acide acétique et II gouttes de réactif de Tanret, on complète à $100^{c.c.}$ et on filtre, après mélange.

On opère sur $5^{c.c.}$, soit avec VI à VIII gouttes de réactif S. M. au quart, en nature, plus III gouttes du même réactif réduit par le cuivre et 12 secondes d'ébullition; soit avec du cuivre en tournures et X gouttes de réactif S. M. au quart et 30 secondes d'ébullition.

Avec les laits pauvres en protides, comme celui de femme par exemple, on complète seulement le volume final à $50^{c.c.}$ et, après filtration, on opère de préférence avec le cuivre en tournures (5 à 6 centigrammes).

e. Cas de la salive. — On prend 1 gramme de ce liquide, on étend à $50^{c.c.}$ avec de l'eau, on filtre et l'on opère sur $5^{c.c.}$ du filtrat comme avec les liquides précédents.

f. Autres principes biochimiques. — On voit qu'avec de très légéres variantes, on peut déterminer le phosphore minéral ou organique dans tous les produits bio-chimiques animaux ou végétaux par le méthode céruléo-molybdimétrique qui peut-être, ainsi, considérée, pour le dosage très rapide du phosphore, comme d'une universalité absolue.

---

[13]) En minéralisant le sang total par les méthodes connues, mais en opérant avec des dilutions au moins dix fois plus fortes du résidu hématique, repris par l'acide sulfurique dilué, mais sans faire intervenir de réactif de Tanret — inutile en l'absence d'albuminoïdes — on pourra effectuer des micro-dosages de phosphore total du sang avec de très faibles quantités de ce liquide (moins d'une goutte). Cette minéralisation pourra être faite sur les autres liquides de l'organisme.

Applications de la méthode céruléo-molybdimétrique au cas de l'arsenic.

Tout ce qui vient d'être dit pour le phosphore serait rigoureusement applicable à l'arsenic si ce métalloïde était aussi diffusé dans la nature que son congénère. Mais c'est surtout dans l'appréciation quantitative des taches et anneaux arsenicaux obtenus dans les expertises légales, par exemple, que la méthode céruléo-molybdimétrique peut-être d'un usage précieux.

Il suffira, pour en faire usage, de traiter ces résidus arsenicaux par NO^3H, d'évaporer à sec et de dissoudre, l'acide arsénique formé, dans 5^{cc} on un plus grand volume d'eau — suivant l'importance apparente de sa messe — enfin, de traiter ces solutions comme celles de P^2O^5 mais en préparant les étalons de comparaison avec des liqueurs titrées d'arséniate disodique.

On peut, ainsi, évaluer exactement la teneur en arsenic de taches ou d'enduits ne contenant pas plus d'un millième de milligramme de ce métalloïde.

Mikrochemischer Beitrag zur Bakterizidie von Silber und Kupfer.

Von **C. Egg** und **A. Jung.**

(Aus der Physiologisch-chemischen Anstalt der Universität Basel.)

(Eingelangt am 5. Juni 1929.)

Zu den großen Fortschritten der analytischen Technik, die wir F. PREGL verdanken, dem diese Arbeit einen Gruß zum 60. Geburtstag aus der physiologisch-chemischen Anstalt in Basel bringen soll, gehört die Möglichkeit, auch minimale Quantitäten Kupfer mit größter Exaktheit bestimmen zu können. Wir haben dieses Verfahren benützt, um in exakter Weise die Kupfermengen mikrochemisch zu bestimmen, welche zur Abtötung bestimmter Bakterienmengen ausreichend sind. Uns leitete dabei die Frage, welche Mengen von dem für die Wassersterilisierung, namentlich in Amerika, viel benutzten Kupfer hierzu ausreichend sind. Speziell interessierte uns aber die Frage, ob Kupfer wirklich das geeignete Material hierfür ist, oder ob dem Silber nicht der Vorzug einzuräumen sei. Letzteres wäre namentlich deshalb von Interesse, weil für das Säugetier Silber weniger giftig zu sein scheint als Kupfer.

Zu diesem Zweck mußten chemische Untersuchung und bakteriologische Prüfung Hand in Hand gehen. Wir teilten uns so in die Arbeit, daß die eine von uns (DR. E.) den chemischen, der andere den bakteriologischen Teil übernahm.

Ein expeditives Verfahren für die Silberbestimmung ergab sich aus der Anwendung der PREGL'schen Mikroelektrolyse auf angereicherte Silberlösungen. Wo es sich um sehr silberarme Lösungen handelt, werden zwei bis fünf Liter des zu untersuchenden Wassers in ein bis zwei Abdampfschalen aus Jenaerglas von 200 ccm Inhalt auf dem Wasserbad eingedampft. Der Rückstand wird wiederholt mit konzentrierter Salpetersäure abgeraucht, wobei durch Umrühren mit einem Glasstab darauf zu achten ist, daß die Schale überall, wo sie mit Silberwasser in Berührung war, von der Säure benetzt wird, andernfalls können durch Adsorption des Silbers an die Glaswand Verluste eintreten. Hierauf wird das Silber durch viermaliges Ausspülen der Schale mit je 3 ccm 2 n-Ammoniak aufgenommen und durch ein Filterchen in ein Mikroelektrolysiergefäß filtriert. Die Silberabscheidung erfolgt bei einer Spannung von 1 bis 1,2 Volt in der Wärme.

Die Elektrodenzunahme wird auf einer Mikrowaage (BUNGE) bestimmt. Hierbei beträgt der Wägefehler einer vollständigen Bestimmung zirka 10 Gamma. Da diese Silbermenge bei dem geringen Silbergehalt einzelner Lösungen noch ins Gewicht fällt, und es außerdem bei der Verarbeitung von gewöhnlichem Grund- oder Flußwasser vorkommen kann, daß sich an die Elektrode noch Spuren von Hummusstoffen setzen, schließen wir an die elektrolytische Abscheidung noch eine genaue Bestimmung und Identifizierung des Niederschlages als Silber an.

Zu diesem Zwecke bedienen wir uns des von F. FEIGL[1] beschriebenen, sehr empfindlichen und spezifischen Nachweises für Silber mittels p-Dimethylaminobenzylidenrhodanin. Das Silbersalz dieser Verbindung stellt einen in Äther unlöslichen, roten Körper dar, während das Reagens selbst mit gelber Farbe ätherlöslich ist. F. FEIGL und J. POLLACK[2]) haben schon früher mit einem anderen Rhodaninderivat das Silber gefällt und den erhaltenen Niederschlag im Mikrofilterröhrchen gewogen; sie erzielten damit Analysenresultate, mit einer Fehlerbreite von 10 γ (— 4 bis + 6). Wir fanden, daß sich die von FEIGL beschriebene rote Silberverbindung außer zu der doch immer zeitraubenden gravimetrischen Bestimmung auch zur rascheren titrimetrischen Auswertung verwenden läßt. Schüttelt man eine verdünnte Silberlösung mit Äther, dem man ein bis zwei Tropfen einer 0,03%igen azetonischen Lösung von Rhodanin zusetzt, so erscheint an der Trennungsfläche Äther Wasser ein rotes Häutchen; der Äther ist bei Rhodaninüberschuß gelb gefärbt. Versuche, bei bekanntem Rhodaninzusatz nach der Ausschüttelung aus der Färbung des Äthers rein empirisch zu einer quantitativen Silberbestimmung zu kommen, schlugen fehl, desgleichen Bemühungen, mit bekannten Silbermengen die unbekannte Lösung bis zur Entfärbung des Rhodanins zu titrieren. Dagegen läßt sich das Silber auf zwei Gamma genau bestimmen, wenn der Silberrhodaninkomplex lediglich als Indikator angewendet wird bei einer Titration in neutraler Lösung mit n 1000 Kaliumjodidlösung.

Zur Bestimmung des Elektrodenniederschlages wird dieser mit Salpetersäure abgelöst, die Lösung in einer Platinschale eingedampft, der Rückstand mit 0,5 bis 1 ccm Wasser aufgenommen

[1]) Ztschr. f. anal. Chem. *74*, 380 (1928).
[2]) Mikrochemie *4*, 185 (1926).

und in ein kleines Reagensglas übergespült. Nach Überschichten mit Äther, dem azetonische Rhodaninlösung zugesetzt ist, und Durchschütteln bildet sich bei Anwesenheit von nur ein Gamma Silber ein rotes Häutchen an der Trennungsfläche. Zur genauen Bestimmung gibt man einen Überschuß an n/1000 Kaliumjodidlösung hinzu und titriert unter Zugabe von n/1000 Silbernitratlösung aus einer in $^1/_{100}$ ccm geteilten Bürette unter Umschütteln nach jeder Zugabe zurück, bis ein rotes Häutchen an der Grenzfläche sichtbar wird. Diese Titration eignet sich für Silbermengen von 1 bis zirka 200 Gamma.

Modellversuche an reinen Silbernitratlösungen von 50 bis 100 Gamma Silber ergaben bei der Abscheidung bei 1 Volt stets nur Ausbeuten von 85 bis 90%. Es zeigte sich, daß die letzten Silberreste von zirka 10 Gamma sich erst bei höherer Spannung niederschlagen und bei der Kupferfraktion (2 Volt) zu finden sind. Da Kupfer mit dem Rhodanin keine in Äther schwerlösliche Verbindung gibt, läßt sich aus dem Kupferniederschlag der Silberanteil mit der Rhodaninmethode noch genau bestimmen.

Als Beleg für die Leistungsfähigkeit unserer Methode sei folgender Modellversuch wiedergegeben: 3 Liter einer verdünnten, schwach salpetersauren Lösung von Silbernitrat mit einem Silbergehalt von 35,7 Gamma/Liter wurden verarbeitet und 35,0 Gamma Silber/Liter wiedergefunden. Aus neutralen Silberlösungen tritt bei längerem Stehen in Glasflaschen leicht eine Adsorption von Silber an die Glaswand ein. So enthielt eine neutrale Silbernitratlösung mit einem Anfangsgehalt von 35,7 Gamma Silber/Liter nach achttägigem Stehen in einer Glasvorratsflasche nur noch 33,1 Gamma Silber/Liter und eine annähernd gesättigte Lösung von Silberchlorid mit einem Silbergehalt von 890 Gamma Silber/Liter, die 39 Tage in einer Glasflasche gestanden hatte, wies nur noch einen Silbergehalt von 534 Gamma Silber/Liter auf.

Bei unseren vergleichenden Untersuchungen über die oligodynamische Wirksamkeit von Silber und Kupfer wendeten wir ein hochdisperses Präparat von metallischem Silber, Katadyn (Krause), an. Die Löslichkeit dieses Silbers in Wasser, die abhängig ist von der Intensität der Berührung von Silber und Wasser sowie von Lösungsgenossen, betrug beim Schütteln von 3 g Katadyn mit 3 Liter glasdestilliertem Wasser in Abhängigkeit von der Schüttelzeit:

Schüttelzeit	ohne Schütteln über Silber gestanden	Silbergehalt/ Liter
1 Stunde		31,3 Gamma
4 Stunden		68,6 „
7 „		90 „
15 „	12 Stunden	112 „
27 „	15 „	139 „

Wird gleichzeitig mit dem Silber noch metallisches Kupfer geschüttelt, so wird dadurch, wie zu erwarten, die Löslichkeit des Silbers herabgedrückt: beim Schütteln von 0,25 g Katadyn mit 5 Liter glasdestilliertem Wasser, das von der Destillation her (Kupferkühler) noch 230 Gamma Kupfer/Liter enthielt, waren nach 10 Stunden 35 Gamma Silber/Liter in Lösung gegangen. Wurde das Katadyn aber gleichzeitig mit 0,2 g Kupfer in 5 Liter Wasser geschüttelt, so gingen nur noch 9 Gamma Silber/Liter in Lösung.

Als biologisches Testobjekt wählten wir *Bact. Coli*, da ja bekanntlich der Colititer als Maß der Verwendbarkeit eines Wassers benutzt wird. Wir wollen darum auch aus unseren Befunden nicht Schlüsse auf die Abtötung anderer Keime ziehen, bevor die dahingehenden Untersuchungen zu einem genügenden Abschluß gekommen sind. Finden sich doch in der Literatur mehrfache Angaben, daß die verschiedenen Bakterienarten gegen Silber, Kupfer und andere Metalle verschieden empfindlich sind.

Für das Silber war zuerst die Vorfrage zu erledigen, ob metallisches, kolloidales, ionisiertes und komplexgebundenes Silber die gleiche oder eine verschiedene Wirksamkeit zeigten. Es war schon mehrfach vermutet worden, wir nennen nur R. Doerr[3]), D. Acel[4]), daß die Silberionen das wirksame Prinzip seien, und R. Doerr hatte dies bereits durch Vergleich der Wirkungen einer Silberoxydlösung und einer Lösung, die aus Silberblech gewonnen worden war, sehr wahrscheinlich machen können. Später ist von K. v. Neergaard[5]) durch potentiometrische Bestimmungen (Elektrotitration) der Frage nachgegangen worden. Er fand in seinen mit Silberblech aktivierten Lösungen im Mittel 500 γ Ag/L und kam zu dem Schluß, daß das oligodynamische Agens eine ionisierte Silberverbindung sein muß. Gegen seine Methodik bestehen freilich gewisse

[3]) Biochem. Ztschr. *106*, 110 (1920); *107*, 207 (1920); *113*, 58 (1921); *131*, 357 (1923).

[4]) Biochem. Ztschr. *112*, 23 (1920).

[5]) Arch. f. exp. Path. und Pharm. *109*, 164 (1925).

Bedenken, ob sie wirklich geeignet ist, so kleine Silbermengen, wie sie oft in Silberwässern vorkommen, genau zu bestimmen. Erst nach Abschluß unserer diesbezüglichen Versuche, über die bereits im Jänner dieses Jahres vor der Chemischen Gesellschaft in Basel berichtet wurde, kam uns die Arbeit von H. FREUNDLICH und K. SÖLLNER[6]) zu Gesicht, die die von einem Silberblech in Lösung gegangenen Silbermengen zu zirka 20 γ im Liter bestimmten und feststellten, daß dieses Wasser auf Algen gleich wirkte, wie eine Silbernitratlösung von gleichem Gehalt. Sie schließen daraus, daß die Wirkung auf dem Gehalt an Silberionen beruhen müßte.

Wir gingen bei unseren Untersuchungen folgendermaßen vor. Die Versuchslösungen (je 100 bis 200 ccm) wurden mit Coliaufschwemmungen beimpft, die von ein- bis viertägigen Agarplattenkulturen von 2 bis 4 Stämmen hergestellt waren. Wir rechneten für je 10 ccm Aufschwemmung eine Öse *Bact. Coli* und gaben davon zu je 100 ccm Versuchslösung je 1 ccm. Die Zahl der Bact. im ccm Versuchslösung schwankte so, hauptsächlich abhängig vom Alter der Kulturen, zwischen 100.000 und 1 Million. Zur Herstellung der Zählplatten verwendeten wir 0,05 bis 0,5 ccm der Kontrollen in 2%igem Agar. Die Agarplatten waren immer sehr klar und gut durchsichtig, so daß das Auszählen mittels des Mikroskopes keine Schwierigkeiten bot.

Nach bestimmten Zeiten, meistens nach 6, 24 und 48 Stunden, wurden Proben entnommen, und zwar wurden 20 ccm zur Anreicherung in ERLENMEYER-Kölbchen mit 1 ccm EIJKMANN'scher Nährflüssigkeit gemischt und 1 ccm mit 2%igem Agar zur Platte gegossen, wobei die Temperatur des Agars 45° nicht überstieg. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37° gehalten, die Platten 72 Stunden beobachtet, die Anreicherungen bis 120 Stunden. War bis dahin nichts gewachsen, so wurde angenommen, daß die Lösung steril war. In zweifelhaften Fällen wurden die *Bact. Coli* durch Überimpfen auf Endoagar identifiziert. Da wir fast durchwegs frisch hergestelltes glasdestilliertes Wasser verwandten, hatten wir nur ganz selten Verunreinigungen. Um möglichst vergleichbare Resultate zu haben, setzten wir immer größere Versuchsreihen von zirka 30 Lösungen an, die aus der gleichen Aufschwemmung beimpft wurden und unter den gleichen Versuchsbedingungen standen. Fast alle untersuchten Lösungen wurden mindestens zweimal geprüft, um Zufälligkeiten möglichst vermei-

[6]) Biochem. Ztschr. *203*, 3 (1928).

den zu können. Alle verwendeten Glaswaren waren vor der gründlichen Reinigung zirka 24 Stunden mit konzentrierter Salpetersäure gestanden, um das an die Glaswände adsorbierte und aufgenommene Silber wieder herauszulösen, das heißt gegen Wasserstoffionen auszutauschen.

Versuchsresultate.

I. Silber.

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, wirkten Lösungen von Silbernitrat, -chlorid, -carbonat, -cyanid, -oxyd, ja auch diejenigen organischer Silbersalze, wie Silberstearat und -palmitat, gleich wie Lösungen von metallischem Silber, wenn nur die gleiche Silbermenge vorhanden war. Soweit man in biologischen Versuchen überhaupt von Gesetzmäßigkeiten reden darf, waren die Lösungen, bei unseren Bakterienstämmen, unter unseren Versuchsbedingungen und Versuchsanordnungen imstande, 100.000 bis 500.000 (in einzelnen Reihen bis 1 Million) Keime im ccm in 24 Stunden abzutöten, wenn der Silbergehalt höher war als 40 γ im Liter. Schon zwischen 25 und 40 γ im Liter trat oft Sterilisation ein, unterhalb 25 γ war mehr oder weniger starke Hemmung des Wachstums bemerkbar bis zu zirka 1 γ. Über Versuche mit höheren Bakterieneinsaaten wird an anderer Stelle berichtet werden.

Die Prägnanz dieser Resultate erlaubt eine andere Frage experimentell anzugehen, namentlich inwieweit kolloidales Silber in seiner bakteriziden Wirkung dem ionalen gleichkommt, bezw. es übertrifft. J. Voigt[7]) hat kürzlich in seiner Monographie über das kolloidale Silber gezeigt, wie wenig exakt die Bestimmungen nach dieser Richtung sind, die sich in der Literatur fortschleppen. Da die meisten kolloidalen Silberpräparate Schutzkolloide enthalten, die eventuell den Versuch stören könnten, stellten wir uns eine Silberoxydlösung her, hielten den einen Teil im Dunkeln in einer braunen Flasche, den anderen Teil kochten wir 7 Minuten und ließen ihn an der Sonne stehen, bis er dunkelbraun gefärbt war. Beide Teile wurden dann gesondert chemisch und bakteriologisch geprüft. Die Resultate haben wir in Tabelle II zusammengefaßt.

Es zeigte sich also deutlich, daß die kolloidale Lösung bei gleichem Silbergehalt viel langsamer wirkte und ein höherer Silbergehalt notwendig war, um innerhalb 24 Stunden sichere Sterilität

[7]) Das kolloide Silber; Kolloidforschung in Einzeldarstellungen, Bd. 8. Leipzig 1929; Klinische Wochenschr. 1928, S. 1417.

zu bewirken. Damit schien es uns bewiesen, daß das kolloidale Silber sicher weniger wirksam sei, wenn es überhaupt wirkt, vor allem, wenn man bedenkt, daß bei unserer Versuchsanordnung bei den großen Verdünnungen aus dem kolloidalen Silber wieder ionales abgespalten wird (vgl. VOIGT).

Nun beschritten wir auch den anderen Weg, das Silberion aus der Lösung zu entfernen, ohne den Silbergehalt zu ändern, den der Komplexbildung. Schon B. KRÖNIG und TH. PAUL[8]) hatten nachgewiesen, daß Silberwässer durch Zusatz von Zyankali oder Thiosulfat unwirksam werden können, was R. DOERR für das Zyankali bestätigte. Da wir nun den Silbergehalt unserer Lösungen genau kannten, war es uns auch möglich, die Komplexbildung verschieden zu gestalten und dabei die Abnahme der Wirkung zu verfolgen. Wir verwandten den Cyanid- und Thiosulfatkomplex.

In Tabelle III geben wir unsere Versuche mit dem Cyanidkomplex wieder. In Tabelle I führten wir das Silbercyanid auf und zeigten, daß es ganz gleich wirkt, wie die übrigen Silbersalze. Anders bei der Komplexbildung. Da nimmt mit zunehmendem Cyanidüberschuß die Wirksamkeit ab, bis bei einem zirka 50- bis 100fachen Cyanidüberschuß die Konzentration an Silberionen so gesunken ist, daß überhaupt keine Wirkung mehr erkennbar ist. Dabei finden wir die gleichen Verhältnisse bei den Silbernitrat-, Silbercyanid- und „Silbermetall"-Lösungen.

In Tabelle IV fassen wir unsere Versuche mit dem Silberthiosulfat zusammen. Wir gingen hier nicht so vor, daß wir eine bestimmte Silbermenge mit zunehmenden Thiosulfatmengen inaktivierten, sondern verwandten ein Präparat, das nach unserer Bestimmung 27,8% Silber enthielt. Es zeigte sich nun überall eine geringe und langsame Wirkung. In fast allen Silberkonzentrationen von 21 bis 2780 γ Silber im Liter war die gleiche Wirksamkeit festzustellen. Da das konstante Glied in diesen Versuchen die Bakterienzahl ist, vermuten wir, daß die Bakterien durch ihren Stoffwechsel das Thiosulfat nach und nach zersetzten und dadurch freie Silberionen schufen, sei es nun, daß dies im Bakterienkörper oder in der Lösung statt hatte. Das Natriumthiosulfat selbst hatte keinen Einfluß auf das Bakterienwachstum.

Dadurch ist erneut festgestellt auf quantitativem Wege, was bisher nur qualitativ festgelegt war, daß durch Komplexbildung die Silberwirkung stark beeinträchtigt oder aufgehoben werden kann.

[8]) Ztschr. f. Hyg. und Inf. *25*, 1 (1897).

Da wir in unseren Versuchen fanden, daß zur Sterilisation mindestens 40 γ im Liter nötig sind, machten wir noch Versuche mit Silbersalzen, deren Löslichkeitsprodukt unterhalb dieser Grenze lag. Das war das Jodid und das Sulfid.

Bei den Versuchen mit Kaliumjodid zeigt sich nun das Eigentümliche, daß scheinbar eine intermediäre Zone besteht (siehe Tabelle V), in der die Wirkung des Silbers aufgehoben wird, während bei einer höheren Konzentration an Kaliumjodid wieder Sterilisation eintritt. Das kommt, wie Versuche zeigten, zum Teil daher, daß Kaliumjodid an sich eine stark wachstumshemmende Wirkung hat, wie die Kontrolle A mit n/40 Kaliumjodid zeigt. Die Konzentration an Silberionen in einer gesättigten Silberjodidlösung ist zu klein, als daß dadurch eine Sterilisierung möglich wäre. Aber für den Vorgang, daß eine an sich weniger wirksame Lösung (n/40 KJ) durch die geringe Quantität an ionisiertem Silberjodid „sensibilisiert" wird, kann man sich schwer eine chemische Vorstellung machen, denn die komplexen Silbersalze, die das Silber im Anion enthalten, sind (siehe die Versuche mit Thiosulfat) bakterizid sehr wenig wirksam. Die Silberionenkonzentration müßte in der n/40 KJ-Lösung sogar noch zurückgedrängt werden.

Genügt das zugesetzte Kaliumjodid nicht zur Fällung des Silbers, dann bleiben natürlich die übriggebliebenen Ionen weiter wirksam. So mußten theoretisch in Versuch 47, V, noch 96 γ Ag/L übrigbleiben. Daß dies annähernd der Fall war, beweist der Versuch, da schon nach 6 Stunden beinahe und nach 24 Stunden die vollkommene Sterilität erreicht war, wie wir es für diese Silberionenmengen schon früher gesehen hatten.

Das Silbersulfid endlich ist so wenig dissoziiert, daß keine Wirkung auf die Bakterien zu erwarten ist. Das zeigt auch der Versuch (siehe Tabelle VI).

Damit dürfte wohl endgültig auch der qantitative Beweis geliefert sein, daß das Silberion das wirksame Prinzip darstellt. Kolloidale Lösungen und Komplexverbindungen können unter anderen Versuchsbedingungen eventuell auch als wirksam gefunden werden. Dies beruht aber, wenn nicht andere Faktoren dafür verantwortlich sind, wohl auf sekundären Prozessen, z. B. auf der Entstehung von Silberionen im Stoffwechsel der Organe und der Zellen, beziehungsweise der Bakterien.

II. Kupfer.

Beim Kupfer lagen die Verhältnisse insofern anders, als seit den älteren Untersuchungen kaum mehr daran gezweifelt wurde, daß die Cupriionen das wirksame Prinzip seien und diese durch Komplexbildung und durch Reduktion unwirksam gemacht werden können. Auch war z. B. bei Wasser, das in Kupfergefäßen destilliert worden war, schon von NÄGELI und SCHWENDENER[9]) angenommen worden, daß seine oligodynamische Wirkung auf dem Kupfergehalt beruhe, was dann von K. SPIRO[10]) durch die PAGENSTECHER'sche Reaktion qualitativ bewiesen wurde. Seit F. PREGL die Mikroelektrolyse einführte, ist es nicht mehr schwer, die in Betracht kommenden Kupfermengen genau zu bestimmen. Wir stellten unsere Versuche sowohl mit Lösungen an, die wir durch Schütteln von Naturkupfer C (KAHLBAUM) mit gewöhnlichem und glasdestilliertem Wasser erhalten hatten, als auch mit Kupfersulfatlösungen und fanden bei gleichem Kupfergehalt auch eine gleiche Wirkung. Die Oligodynamie des Kupfers ist also Ionenwirkung.

Dabei zeigte sich aber, daß von Kupfer viel größere Mengen zur Sterilisation nötig waren, als von Silber, mindestens 600 γ im Liter, um bei unseren Stämmen und einer Keimzahl von 100.000 bis 500.000 in 24 Stunden Sterilisation zu erreichen. Dies gelang aber bei zahlreichen Wiederholungen der Versuche nicht durchweg, ja gelegentlich bei einem Kupfergehalt einer Kupfersulfatlösung von 5500 γ im Liter trat erst nach 48 Stunden Sterilisation ein. Also braucht man nicht nur eine bedeutend größere Kupfermenge zur Sterilisation, sie ist auch nicht so sicher wie diejenige mit Silber. Wir brauchen mindestens die 20fache Menge. Es war daher zu untersuchen, ob nicht durch Kombination von Silber und Kupfer noch bessere Resultate zu erzielen wären.

III. Kupfer und Silber zusammen.

Es zeigte sich nun tatsächlich, daß sich die Wirksamkeit der Silber- und Kupferionen addiert (siehe Tabelle VIII), und zwar ungefähr in dem Verhältnis, daß 20 Teile Kupfer einem Teil Silber gleichgesetzt werden können. Demnach etwa dasselbe Verhältnis, das wir für die verschiedene Sterilisationskraft der beiden Metalle gefunden hatten. Teilweise war die Wirkung sogar noch stärker als die von Silberionen in gleicher Menge. Da wir aber nicht über eine

[9]) Denkschriften der schweiz. Naturforscher-Ges. *33*, 1 (1893).

[10]) Biochem. Ztschr. *74*. 265 (1916); Münch. med. Wochenschr. 1915, S. 1601.

Tabelle I.

Silber.

Zahl der Keime im ccm 100.000 bis 800.000.

s = steril, sH = sehr starke Hemmung, H = Hemmung, gH = geringe Hemmung, O = ohne Wirksamkeit.

Silber γ/L	Ausgangsmaterialien	Wirkung nach 6 Stunden	Wirkung nach 24 Stunden	Wirkung nach 48 Stunden
950	Ag-Palmitat, Ag Stearat, $AgNO_3$, AgCN, Ag_2CO_3, Ag	s	s	s
700	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, $AgNO_3$, AgCN, Ag_2CO_3, Ag	s	s	s
250	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, $AgNO_3$, AgCN, Ag_2CO_3, Ag, AgCl, Ag_2O	s	s	s
100	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, $AgNO_3$, AgCN, Ag, AgCl, Ag_2O	s	s	s
90	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, $AgNO_3$, Ag_2CO_3, Ag, AgCl	sH	s	s
78	Ag	sH	s	s
62	AgCN	sH	s	s
60	AgN_3, Ag	s	s	s
55	AgCN, Ag_2C_2, Ag_2O	sH	s	s
45	AgCN, Ag, AgCl	sH	s	s
38	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, Ag, AgCl	H-sH	sH-s	s
30	$AgNO_3$, AgCN, Ag_2CO_3, Ag, AgCl	H-sH	sH-s	sH-s
25	$AgNO_3$, AgCN, Ag, AgCl, Ag_2O	H-sH	sH-s	sH-s
22	$AgNO_3$, AgCN, Ag, AgCl	O-H	H-sH	H-sH
19	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, $AgNO_3$, AgCN, Ag	H	H-sH	H-sH
15	$AgNO_3$, AgCN, Ag_2CO_4, Ag, AgCl, Ag_2O	H	H-sH	H-sH
10	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, $AgNO_3$, Ag, AgCl	O-H	O-H	H-sH
6	$AgNO_3$, AgCN, Ag, AgCl	O-H	O-H	H-sH
3	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, AgCN, Ag	O-H	O-H	O-sH
1	Ag-Palmitat, Ag-Stearat, Ag	O-H	O-H	O-H

genügend große Zahl von Versuchen verfügen, können wir noch nicht sagen, ob darin ein Zufall liegt oder eine Gesetzmäßigkeit. Eine erhebliche „Potenzierung" über die Addition hinaus findet aber nicht statt.

Kurz angeführt sei zum Schluß, daß nach Versuchen, die Herr cand. med. Hosz in unserem Institut ausführt, bisher noch kein Metall gefunden wurde, dessen Ionen auf unsere Colistämme von gleich starker Wirkung gewesen wären, wie die des Silbers und Kupfers.

Tabelle II.

Silberoxyd. kolloidales Silber.

12. 3. Versuch Nr. 58. Silberoxyd in brauner Flasche gelöst in glasdest. Wasser, enthält 38 mg Ag/L. Ein Teil davon 7 Minuten gekocht, in der Sonne stehengelassen, bis braun, enthielt jetzt 35 mg Ag/L. *Bact. Coli:* 700.000 Keime in ccm.

19. 3. Versuch Nr. 62/63. Gleiche Lösungen wie oben, die kolloidale Lösung ist jetzt noch viel dunkler. *Bact. Coli:* dreitägige Kulturen 305.000 Keime in ccm.

13. 5. Versuch Nr. 85. Gleiche kolloidale Lösung wie oben, fast schwarz. *Bact. Coli:* 48stündige Kulturen, 950.000 Keime in ccm.

Versuch Nr.	Silber γ/L	Wirkung nach Stunden:							
		3 koll.	3 Ag_2O	6 koll.	6 Ag_2O	24 koll.	24 Ag_2O	48 koll.	48 Ag_2O
58 I, VII k	210	gH	sH	sH	s	s	s	s	s
62 I k, 63 I	210			sH	s	s	s		
85 II k	210			s	s	s	s	s	s
58 II, VIII k	105			H	s	s	s	s	s
62 II k, 63 II	105			H	s	sH	s		
85 III k	105			H		s		s	
58 III, IX k	53			H	sH	sH	s	s	s
62 III k, 63 III	53			gH	sH	H	s		
85 IV	52			H	s	sH	s	s	s
62 IV k, 63 IV	26			gH	H	H	sH		

Tabelle III.

a) Silbernitrat + Natriumcyanid.

1. Versuch Nr. 23. 1/1,860.000 n-Silbernitratlösung mit 58 γ Ag/L, hergestellt aus einer 1/92,6 n-Silbernitratlösung durch Verdünnen mit glasdest. Wasser. Natriumcyanidlösungen, hergestellt durch Verdünnen einer 1/1000 n-Lösung mit glasdest. Wasser. *Bact.*

Coli: zweitätige Agarplattenkulturen, im ccm der Versuchslösungen 252.000 Keime.

2. Versuch Nr. 28. Gleiche Lösungen wie oben, *Bact. Coli:* fünftägige Agarplattenkulturen (gleiche Kulturen wie oben), 190.000 Keime.

s = steril, sH = sehr starke Hemmung, H = Hemmung, gH = = sehr geringe Hemmung, O = ohne sichtbare Wirksamkeit.

Versuch Nr.	Silber 1/1,860 000 n γ/L	Natriumcyanid	Ergebnis nach Stunden: 6	24	48
23 I	58	1/2000 n	O	O	O
23 II	58	1/20.000 n	O	O	O
28 I	58	1/20.000 n	O	O	gH
28 II	58	1/40.000 n	gH	H	sH
28 III	58	1/80.000 n	gH	sH	sH
28 IV	58	1/160.000 n	H	s	s
28 V	58	1/200.000 n	H	s	s
23 III	58	1/200.000 n	sH	s	s
23 IV	58	1/400.000 n	s	s	s
23 V	58	1/800.000 n	s	s	s
23 VI	58	1/1,600.000 n	s	s	s
A	58	—	s	s	s
B I	—	1/10.000 n	O	O	O
B II	—	1/400.000 n	O	O	O
C	—	glasdest. Wasser	O	O	O

b) Silberlösung aus metallischem Silber + Natriumcyanid.

Versuch Nr. 30. Die Ausgangslösung enthielt 238 γ Ag/L, die Natriumcyanidlösung wie unter a) angegeben. *Bact. Coli:* zweitägige Kulturen, 395.000 Keime im ccm.

Versuch Nr.	Silber 1/908.000 n γ/L	Natriumcyanid	Ergebnis nach Stunden: 6	24	48
I	119	1/2000 n	O	O	O
II	119	1/8000 n	O	O	O
III	119	1/16.000 n	O	O	O
IV	119	1/32.000 n	gH	gH	H
V	119	1/64.000 n	H	s	s
VI	119	1/128.000 n	s	s	s
VII	119	1/256.000 n	s	s	s
VIII	119	1/512.000 n	s	s	s
IX	119	1/1,024.000 n	s	s	s
A	119	—	s	s	s

in den übrigen Kontrollen reichliches Wachstum wie oben.

c) Silbercyanid + Natriumcyanid.

Versuch Nr. 31. Silbercyanid, hergestellt aus Silbernitrat und Natriumcyanid, unter Vermeidung eines Überschusses. Silbergehalt der gesättigten Silbercyanidlösung: 1.002 mg/L. In den Versuchslösungen je 50 γ Ag/L. Natriumcyanidlösungen wie oben, *Bact. Coli* wie in Versuch Nr. 30 (siehe b).

Versuch Nr.	Silber 1/2.106,000 n	Natriumcyanid	Ergebnis nach Stunden:		
			6	24	48
I	50	1/2000 n	O	O	O
II	50	1/20.000 n	O	O	O
III	50	1/40.000 n	O	O	gH
IV	50	1/80.000 n	gH	gH	H
V	50	1/160.000 n	gH	H	sH
VI	50	1/320.000 n	sH	sH	sH
VII	50	1/640.000 n	sH	s	sH
VIII	50	1/1,280.000 n	s	s	s
AgCN	50	—	sH	s	s

übrige Kontrollen zeigen gutes Wachstum, wie unter a).

Tabelle IV.

Silbernatriumthiosulfat.

Versuch Nr. 39. 0,1000 g kristallisiertes Silbernatriumthiosulfat wird in 200 ccm glasdest. Wasser gelöst. Diese Lösung enthielt 139 mg Ag/L. Davon 1000fache Verdünnung mit glasdest. Wasser. *Bact. Coli:* 24stündige Kulturen, 836.000 Keime im ccm.

Versuch Nr. 69. 0,1000 g des gleichen Salzes in 100 ccm glasdest. Wasser gelöst, davon 100fache Verdünnung. Natriumthiosulfatlösung: ungefähr äquivalent dem Silberkomplexsalz in der Ausgangslösung 7,5 mg/L. *Bact. Coli:* dreitägige Kulturen, 469.000 Keime im ccm.

Versuch Nr.	Silber (als Komplexsalz) γ Ag/L	Natrium-thiosulfat γ/L	Ergebnis nach Stunden:		
			6	24	48
69 I	2780		H	H	H
69 II	1340		H	H	H
69 III	695		H	H	H
69 VI	347		gH	H	H
69 V	173		gH	H	H
39 I	139		H	H	H
69 VI	87		gH	H	H
39 II	70		gH	H	H
69 VII	43		gH	H	H
39 III	35		gH	H	H
69 VIII	21		gH	H	gH
69 IX	—	7500	O	O	gH
69 X	—	750	O	O	gH

Tabelle V.

Silberlösungen + Kaliumjodid.

Versuch Nr. 47. Verdünnungen einer frisch hergestellten 1/9250 n-$AgNO_3$-Lösung mit glasdest. Wasser. Die Endkonzentration an Silber ist 437 γ/L = 1/247.000 n. Zugefügt Verdünnungen einer n/10-KJ-Lösung. *Bact. Coli:* ein- und viertägige Agarplattenkulturen. Zahl der Keime im ccm 308.000.

Versuch Nr. 48. Verdünnungen einer Lösung von metallischem Silber, Endkonzentration 450 γ/L, also 1/241.000 n. Gleiche KJ-Lösung und gleiche Bakterien wie oben.

Versuch Nr.	Silber	Kaliumjodid	Wirkung nach Stunden:		
			6	24	48
47 I	1/247.000 n	1/40 n	sH	s	s
48 I	1/241.000 n	1/40 n	s	s	s
47 II	1/247.000 n	1/40.000 n	O	gH	H
47 III	1/247.000 n	1/80.000 n	O	O	H
48 II	1/241.000 n	1/160.000 n	O	gH	H
47 IV	1/247.000 n	1/160.000 n	O	H	H
47 V	1/247.000 n	1/320.000 n	sH	s	s
48 III	1/241.000 n	1/320.000 n	sH	s	s
A	—	1/40 n	H	sH	sH
B	—	1/80.000 n	O	O	O
C	—	—	O	gH	gH
D	—	—	O	gH	gH

Tabelle VI.

Silbernitrat + Natriumsulfid.

Versuch Nr. 86. Eine 1/10.000 n-$AgNO_3$-Lösung, die vor einigen Tagen hergestellt wurde, wird mit glasdest. Wasser verdünnt. Zu 200 ccm dieser Verdünnungen wird je 1 ccm einer 1/200 n-Na_2S-Lösung zugegeben, deren Endkonzentration also 1/40.000 n ist, das heißt ein mindestens zwölffacher Überschuß. *Bact. Coli:* 48stündige Kulturen 950.000 Keime im ccm.

Versuch Nr.	Silber γ/L	Na_2S	Ergebnis nach Stunden: 6	24	48
I	216	+	0	0	0
II	108	+	0	0	0
III	54	+	0	0	0
A	54	—	sH	s	s
B	—	+	0	0	0
C	—	—	0	0	0
D	—	—	0	0	0

Tabelle VII.

Kupfer.

Zahl der Keime im ccm 100.000 bis 500.000.

Kupfer γ/L	Ausgangsmaterial	Wirkung nach Stunden: 6	24	48
5500	Cu, CuS	sH	sH-s	s
3600	Cu, $CuSO_4$	H-s	sH	sH-s
2500	Cu, $CuSO_4$	sH-s	sH-s	
1800	Cu, $CuSO_4$	H	sH-s	sH-s
1250	Cu, $CuSO_4$	sH	s	s
900	Cu	H	sH	s
660	Cu. $CuSO_4$	H-sH	sH-s	
450	Cu	H	sH	sH
330	Cu, $CuSO_4$	O-H	H	
250	Cu	H	H	
125	Cu, $CuSO_4$	O-H	H	
80	$CuSO_4$	O	O	

Tabelle VIII.

Kupfer und Silber zusammen.

Zahl der Keime im ccm 100.000 bis 800.000.

Silber γ/L	Kupfer γ/L	Ag + Cu als Ag-Werte 20 Cu=1 Ag	Wirkung nach Stunden: 6	24	48
60	202	70		s	—
30	431	51	sH	s	—
15	545	42	sH	s	—
30	101	35	H	s	—
15	380	32		s	—
15	297	30	sH	s	—
$7^1/_2$	355	25		s	—
15	215	25	H	s	—
15	174	24	sH	s	—
$7^1/_2$	108	13	H	s	—
$7^1/_2$	25	10		H	—
4	54	7	H	H	—

Zur radiometrischen Mikroanalyse.

Von **Rudolf Ehrenberg.**

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Göttingen.)

(Eingelangt am 12. Juli 1929.)

Die im Prinzip und einigen biologisch wichtigeren Anwendungen anderenorts[1]) dargestellte Methode der radiometrischen Mikroanalyse beruht auf der Mitfällung eines radioaktiven Elements mit ausfallenden Niederschlägen. Verwendet wurde bisher nur das Bleiisotop Thorium B, das relativ wohlfeil und leicht zu gewinnen ist und wegen seiner kurzen Halbwertszeit nicht die Gefahr der radioaktiven Verseuchung der Instrumente und Gerätschaften mit sich führt. Gemeinsam ist allen Bestimmungen der Ausgang der analytischen Operationen in eine Fällung, welche einen proportionalen Anteil des Thorium B mit niederschlägt sowie die elektrometrische Bestimmung der restierenden strahlenden Substanz im aliquoten Teil der überstehenden Lösung.

Die analytische Endfällung ist bei einem Teil der Bestimmungen die eines Bleisalzes, hier verteilt sich das Thorium B zwischen Niederschlag und Lösung nach Maßgabe des in der letzteren verbleibenden relativen Bleigehaltes. In diesen Fällen kann daher die eigentliche Analyse auch durch eine Fällung mit nichtindiziertem (Thorium-B-freiem) Blei beendet und späterhin die Bestimmung des gelöst verbliebenen Bleis auf radiometrischem Wege angeschlossen werden. Als solche, für die verschiedenen Analysengänge einheitliche abschließende Bleibestimmung hat sich am besten bewährt der Zusatz von 0,5 ccm indiziertem n 1000-Bleinitrat zu 1 ccm der fraglichen bleihaltigen Lösung und Ausfällung mit 0,5 ccm n 1000-Kaliumchromat, der restierende Thorium-B-Anteil geht mit der Menge des gefragten Bleis, geeicht wird direkt auf das eigentliche Analysenobjekt.

Bei einem anderen Teil der Analysen ist die Endfällung keine solche von Blei, sondern irgendeinem anderen Salz, das, wie die Erfahrung gezeigt hat, das Thorium B mitreißt, und zwar innerhalb eines gewissen, jeweils festzustellenden Bereiches proportional der Menge des ausfallenden Niederschlages. Von solchen Fällungen wurden bisher als brauchbar befunden die von Kalzium als Oxalat

[1]) Biochem. Zeitschr. *164*, 183 (1925); *172*, 10 (1926); *183*, 63 u. 68 (1927); *197*, 467 (1928); und Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. *56*, 466.

und Phosphat, die von Eisen als Chromat. Diese Methode hat gegenüber der erstgenannten den Vorzug, daß die Bestimmung nicht durch die Anwesenheit bleifällender Ionen gestört wird, so vor allem, daß die radioaktive Bestimmung bei alkalischer Reaktion vorgenommen werden kann. Allerdings verläuft die Eichkurve hier nicht geradlinig oder ist vielmehr nur innerhalb eines Teilbereiches als annähernd geradlinig zu verwenden, dieser Bereich ist aber — in Anbetracht der analytisch vorgegebenen Mengen — immer weit genug, und die Genauigkeit ist durch mehrfache Parallelbestimmungen fast beliebig zu steigern.

Grundsätzlich wird bei allen Analysen jeweils ein bestimmtes Quantum des erfragten Elements der Analysensubstanz zugefügt, derart, daß dadurch einerseits die Bestimmung in den günstigsten Meßbereich gebracht wird, anderseits alle etwa vorhandenen sonstigen Ionen unter die störungsfähige Konzentration gebracht werden. Außerdem kann von dem zu erzielenden Niederschlag ein Quäntchen in Substanz vorher zugesetzt werden, um die Lösung zu sättigen.

Im nachfolgenden wird über einige weitere Verbesserungen und Modifikationen der Kalium-, Sulfat-, Phosphat- und Karbonat-(C-Bestimmung auf nassem Wege) Bestimmungen berichtet sowie die radiometrische Auswertung der Bestimmung des Natriums als Pyroantimoniat dargestellt werden; ferner werden für einige Analysen allgemein verwendbare Eichkurven angegeben. Bisher waren zu jeder Analysenreihe die Eichwerte eigens mitbestimmt, es läßt sich das aber auf die Festlegung jeweils e i n e s Eichwertes und Umrechnung auf die Aktivitäten einer aus zahlreichen Eichbestimmungen errechneten Einheitstabelle reduzieren. Bei der Errechnung der Eichtabelle wurde eine Aktivität von 10.000 als „Kontrolle", das heißt als die Aktivität des elektrometrisch bestimmten Lösungsvolumen o h n e Fällung zugrunde gelegt. Bei solchen Analysen wie der Kohlenstoffbestimmung, wo die verwendeten definierten Lösungen nicht genau reproduzierbar sind (in Anbetracht der Analysenempfindlichkeit), müssen die Eichwerte auch weiterhin für jede Bestimmungsserie eigens festgelegt werden.

Als Beispiel sei hier eine Kalzium-Eichbestimmung und ihre Umrechnung angegeben:

Kontrolle	4	7	10	13 mg/1000 Ca
11750	7805	5799	4424	3908
10000	6643	4935	3765	3325

Spezielle Bestimmungsverfahren.

1. Kalzium. Wie schon früher berichtet, wird die Kalziumbestimmung nach der Methode der Mitfällung von Thorium B mit dem Kalziumoxalatniederschlag ausgeführt. Zu 1 ccm der kalziumhaltigen Lösung mit einem Kalziumgehalt zwischen 4 und 13 mg/1000 Ca — bester Meßbereich: 7 bis 13 — wird 0,5 ccm gesättigte „indizierte" Ammonoxalatlösung gebracht, drei Stunden stehengelassen, zentrifugiert, 1 ccm der überstehenden Lösung eingedampft und elektrometrisch bestimmt. Zur Indizierung der Oxalatlösung wird nach Zusatz einiger Tropfen Eisessig das mit Thorium B beladene Platinblech eine halbe Stunde in der Lösung belassen, danach wird diese mit Ammoniak gegen Phenolphthalein eben alkalisch gemacht.

Eichtabelle für Kontrollaktivität = 10.000:

4,0	7,0	10	13	16 mg/1000 Ca
6530	4816	3697	2930	2905

2. Kalium. Die früher beschriebene, auf der Kramer-Tisdal'schen Mikroausführung der Nitrokobaltiatmethode beruhende Bestimmung wurde darin modifiziert, daß die radioaktive Endfällung des restierenden Oxalats nicht mit indiziertem Blei, sondern gemäß oben unter 1. als Kalziumfällung ausgeführt wird. Die Modifikation ergab einen günstigeren Meßbereich mit größeren Aktivitätsunterschieden gegenüber dem früheren Verfahren. Der Kobaltnitritniederschlag wurde in der bekannten Weise erzeugt und nach drei Stunden Stehen zentrifugiert und ausgewaschen; Kaliumgehalt zwischen 7,8 und 31,3, günstigster Meßbereich 15,6 bis 23,4 mg/1000 K. Nach dem Auswaschen werden 0,2 ccm n/10-HCl und 0,5 ccm n/100-$KMnO_4$ zugesetzt, der Niederschlag in der Kapillare des Zentrifugenglases aufgewirbelt, genau fünf Minuten im siedenden Wasserbade digeriert und nach Zusatz von 0,5 n/100-Ammonoxalat noch eine halbe Minute. Das restierende Oxalat wird nach Abkühlung mit 0,5 ccm der nachstehend angegebenen Kalziumchloridlösung gefällt, das Gesamtvolumen (graduierte Zentrifugengläser) auf 3 ccm gebracht, drei Stunden stehengelassen, zentrifugiert, 1 oder 2 ccm eingedampft und radiometriert. Die verwendete Kalziumchloridlösung ist ungefähr n/10, sie wird nach Zusatz von drei Tropfen Eisessig mit dem beladenen Platinblech indiziert (20 ccm) und mit 0,1 ccm konzentrierter Ammoniaklösung alka-

lisch gemacht. Eine höhere Alkaleszens ist zu vermeiden, nach Zusatz der Kalziumlösung auftretende braune Trübung zeigt die Unbrauchbarkeit der Bestimmung an. Bei der Feststellung der Kontrollaktivität muß das mit den 0,5 ccm der indizierten Kalziumlösung auf 3 ccm gebrachte Volumen auch die 0,2 ccm n/10-HCl enthalten, andernfalls zeigt die eingedampfte Probe einen viel zu niedrigen Aktivitätswert. Die Untersuchung dieses Einflusses stärkerer Alkaleszens auf die in der Lösung verbleibende Aktivität (Adsorption, Kolloidalität des Thorium B bei alkalischer Reaktion) ist noch nicht abgeschlossen.

Kalium-Eichtabelle für Kontrollaktivität = 10.000:

7,8	15,6	23,4	31,3 mg/1000 K
8666	3696	2527	2146

3. Sulfat. Neben dem früher beschriebenen direkten Verfahren der Sulfatfällung mit indiziertem Blei hat sich eine indirekte Methode, wie sie analog schon für die Chloridbestimmung angegeben wurde, bewährt, die vor der ersteren den Vorzug der geringeren Löslichkeit des Barium- gegenüber dem Bleisulfat hat. Innerhalb eines Sulfatgehaltes, entsprechend 2,7 bis 16 mg/1000 S, wird 0,5 ccm der Analysenlösung mit 0,5 ccm n/500-$BaCl_2$ gefällt, das gelöst verbliebene Barium mit 0,1 ccm n/100-Kaliumchromat, schließlich das restierende Chromat mit 0,5 ccm indiziertem Bleinitrat niedergeschlagen. Die Fällungen werden in einem Zentrifugenglas nacheinander ausgeführt, am Schluß zentrifugiert und 1 ccm der Lösung zur radiometrischen Bestimmung eingedampft; Kontrollaktivität wie sonst, entsprechend 1 ccm des Reaktionsvolumens, ohne Fällung.

S-Eichtabelle für Kontrollaktivität = 10.000:

2,7	4,0	5,3	8,0	16,0 mg/1000 S
9520	7670	5780	2810	493

Bester Meßbereich: 2,7 bis 5,3 mg/1000 S.

4. Phosphat. Diese Bestimmung wurde früher ebenfalls in der Form der direkten Fällung von indiziertem Blei als Phosphat beschrieben. Demgegenüber hat die Methode der Mitfällung der strahlenden Substanz mit ausfallendem Kalziumphosphat den Vorzug größerer Empfindlichkeit und der Ausführung in alkalischer Lösung. Es wird 0,5 ccm der phosphathaltigen, neutralen bis schwach alkalischen Lösung mit 1 ccm einer gesättigten Kalziumchloridlösung gefällt, die nach Essigsäurezusatz indiziert

und mit Ammoniak wieder alkalisch gemacht war; 1 ccm wird nach halbstündigem Stehen und Zentrifugieren eingedampft und radiometriert. Bester Meßbereich zwischen 4,9 und 7,9 mg/1000 P.

Eichtabelle für Kontrollaktivität = 10.000:

3,8	4,9	7,9	16, mg/1000 P.
3752	2960	2047	895

5. Ammoniak- (Stickstoff-) Bestimmung. Der früher beschriebenen Methode der Überdestillation des Ammoniaks und Aufnahme in ein mit 5 ccm n/1000-Bleinitrat (nicht indiziert) beschicktes 10-ccm-Maßkölbchen sowie nach Anfüllung anschließender Bleibestimmung in 1 ccm nach der Chromatmethode sind nur einige Anmerkungen nachzufügen. Statt der Quarzapparatur ist auch eine solche aus bestem Jenaer Geräteglas verwendbar. Wie die Erfahrung gezeigt hat, geht das Ammoniak immer erst mit dem austropfenden Wasser über, man braucht das Destillationsendröhrchen nicht in die Vorlage eintauchen zu lassen und vermeidet so die Gefahr des Zurücksteigens. Die Alkaleszens der Destillationslösung wird zweckmäßig nicht so stark gewählt wie bei den gewöhnlichen Mikrokjeldahldestillationen, 10% Natronlauge (reinstes Natriumhydroxyd, Lösung vorher gekocht, immer gleiche Volumina) ist mehr als genügend. Als Kontrolle dient die Chromat-Bleibestimmung der Auffüllung ohne Ammoniakdestillation.

Eichtabelle für Kontrollaktivität = 10.000:

14	28	42 mg/1000 N.
8290	6539	4843

6. Kohlenstoffbestimmung auf nassem Wege. Für dieses ebenfalls früher beschriebene Verfahren, dessen radiometrischer Teil auch zur Bestimmung kleinster Kohlensäuremengen bei biologischen Versuchen dienen sowie an die Elementaranalyse angeschlossen werden kann, wurden zwei neue Modifikationen ausgearbeitet.

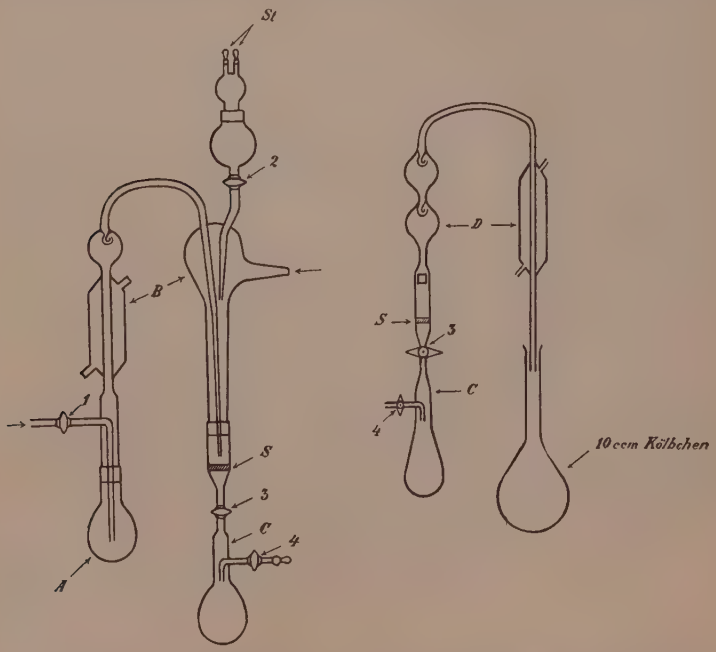
A. Hier entsprechen Apparatur und Verbrennungsweise der früher beschriebenen Methode, die Abweichung betrifft die Weiterbehandlung der Vorlage. Es werden 2 ccm n/100-Bariumhydroxyd vorgelegt, davon wird nach Schluß der Verbrennung und Durchlüftung 1 ccm im Zehner-Maßkölbchen mit 1 ccm n/100-Kaliumchromat versetzt und aufgefüllt. Von der Auffüllung wird 1 ccm mit 1 ccm indiziertem n/1000-Bleinitrat versetzt, zentrifugiert,

1 ccm eingedampft und radiometriert. Hier, wie bei allen Modifikationen der Karbonatbestimmung, müssen die Eichwerte für jede Bestimmungsreihe festgelegt werden, dazu diente eine Salizylsäurelösung von 0,00985 g auf 100 ccm, entsprechend n/100-Karbonat. Als Kontrollaktivität gilt 1 ccm der 1 : 1 verdünnten indizierten Bleinitratlösung.

Beispiele:

Kontrolle	Leerverbrennung	0,5	1,0 Salic.	0,5 „K“
2160	1737	1206	789	
	1738	1226	790	
5000	4130	3380	2170	3350
	4280	3380	2210	3340

„K“ ist ein Kaseinhydrolysat (Schwefelsäure) von einem C-Gehalt, entsprechend c. n/100-Karbonat. Der Kohlenstoffwert der Bestimmungen geht also von 30 bis 60 mg/1000 C.



B. Die zweite Modifikation wurde ausgearbeitet, um eine karbonatempfindlichere Vorlage verwenden zu können und die radiometrische Bestimmung auf die sehr bewährte Ammoniakbestim-

mung hinauszuführen. Als Vorlage diente eine n/500-NaOH, die ein Fünftel gesättigt bezüglich $BaCl_2$ war. Die verwendete Apparatur aus Jenaer Geräteglas (siehe Abb. S. 66) besteht aus vier Teilen, von denen A, B und C während des ersten Teiles der Bestimmung — Verbrennung und Kohlensäureüberführung — in ihren Schliffen zusammengefügt sind, C und D während des zweiten Teiles — Ammoniakdestillation. Während des ganzen ersten Teiles bleibt Hahn 3 geschlossen, Hahn 4 während der ganzen Bestimmung, nachdem zu Beginn durch ihn C etwas evakuiert worden ist. Der Hahn 2 wird geschlossen, nachdem — vor Beginn der Erhitzung von A — die Apparatur kohlensäurefrei gemacht worden ist (kohlensäurefreie Druckluft), alsdann werden aus mit den Stopfen St gleichgeschliffener Bürette 5 ccm der Vorlagelösung in die Aufsatzkugel gelassen und durch Hahn 2, bei schwachem Ansaugen am Luftaustrittsrohr, in den Aufnahmeteil von B gebracht, sie setzen im Hals von C auf der Jenaer Siebplatte S auf. Hahn 2 wird geschlossen, die Verbrennung und langsame Durchlüftung wird anderthalb Stunden in Gang gehalten. Nach anschließendem viertelstündigen Kaltdurchlüften wird Hahn 3 geöffnet und die Vorlage durch die Siebplatte in C gesogen, von dem Aufsatzkölbchen aus werden 2 bis 3 ccm kohlensäurefreien Wassers nachgesogen. Jetzt wird C abgenommen und bei offenem Hahn 3 zum Sieden erhitzt: mit dem Kondenswasser wird der Bariumkarbonatniederschlag aus der Siebplatte hinaufgedrückt und mit zugefügtem, siedeheißem Wasser — bei dauerndem Sieden in C — fortpipettiert. Dann wird in das erkaltende Kölbchen 1 ccm der Ammoniak liefernden Lösung und etwas Nachspülwasser gesogen. Als solche Lösung diente n/100-Ammonazetatlösung, die auf 100 ccm 0,02 ccm Eisessig enthält, diese gibt beim Kochen ohne Alkali kein Ammoniak ab, wohl aber mit der Natronlauge der Vorlage gemäß dem verbliebenen Alkali.

Das Ammoniak wird mit einigen ccm Wasser in ein Zehner-Maßkölbchen überdestilliert (Apparatur C + D), das 5 ccm n/500-Bleinitrat enthält; nach Auffüllen des Kölbchens wird in 1 ccm nach der Chromatmethode mit indiziertem n/1000-Bleinitrat der Bleigehalt radiometriert. Geeicht wird direkt auf Kohlenstoff mit der unter A. genannten Salizylsäurelösung; Kontrolle ist die Ammoniakdestillation mit unverbrauchten 5 ccm der Vorlagelösung.

Beispiele:

Kontrolle	0,25 ccm = 15	0,5 ccm Saliz. s. lsg. = 30 mg/1000 C
1073	3426	4575
1085	3395	4247
1082	2606	4257
	2955	4266
	2965	4250
		4259

7. Natrium. Diese, gemeinsam mit Herrn Dr. med. Hans Naucke ausgearbeitete Methode eignet sich in der vorliegenden Form nur zu Bestimmungen im Mengenbereich der gewöhnlichen Mikroanalyse — Meßbereich zwischen 0,46 und 1,38 mg Na —, dürfte sich aber bei ihrer bequemen Handhabung und guten Genauigkeit zur Natriumbestimmung in Körperflüssigkeiten wohl empfehlen. Sie beruht darauf, daß der in der üblichen Weise erzeugte Natriumpyroantimoniat-Niederschlag in der Hitze mit n/10-HCl — 1 ccm bei den angegebenen Natriummengen — zerlegt und die verbrauchte Salzsäure radiometrisch bestimmt wird. Daß bei diesem Verfahren der Verbrauch an Säure der Menge des Pyroantimoniats proportional ist, war in Vorversuchen mit gewöhnlicher Titration festgestellt worden.

Der Pyroantimoniatniederschlag wird im Zentrifugenglas erzeugt und mit 30% Alkohol ausgewaschen, nach dem Aufwirbeln in etwas Wasser wird er mit 1 ccm n/10-HCl beschickt und eine halbe Stunde im siedenden Wasserbad gehalten, er wandelt sich dabei in die amorphe Antimonsäure um. Es muß jetzt erheblich länger zentrifugiert werden, dann wird die überstehende Lösung mit mehrfachem Nachspülen in ein Fünfziger-Maßkölbchen überführt, je 1 ccm n/10-Soda und n/10-Bleinitrat zugesetzt, aufgefüllt und, nach Abzentrifugieren des Bleikarbonats, je 0,5 ccm mit je 0,5 ccm indiziertem n/1000-Bleinitrat und n/1000-Kaliumchromat versetzt, zentrifugiert und 1 ccm radiometriert. Die Kontrollaktivität wird gewonnen, indem 1 ccm n/10-Bleinitrat auf 50 ccm aufgefüllt und davon 0,5 ccm, wie oben, nach der Chromatmethode bestimmt wird.

Eichtabelle auf Kontrollaktivität = 10.000:

0,46	0,92	1,15	1,38 mg Na
7661	6605	6015	5490

Bestimmung kleiner Mengen von Carotinoiden.

Von **Hans v. Euler, Harry Hellström** und **Margareta Rydbom.**

(Aus dem Biochemischen Institut der Universität Stockholm.)

(Eingelangt am 13. Juli 1929.)

Wohl in keinem anderen Gebiet unserer chemischen Wissenschaft darf und muß so viel und so mannigfaltige Hilfe von analytischen Mikromethoden erwartet werden als in der Biochemie.

Nachdem die Stoffe, welche die Hauptbestandteile des Tier- und Pflanzenkörpers ausmachen, in großen Zügen chemisch aufgeklärt sind, hat die feinere Ausarbeitung der Chemie der Zellkomponenten immer öfter mit Substanzen und Radikalen zu tun, deren Konzentration mit den gröberen analytischen Methoden nicht mehr bestimmt werden kann. Lebenswichtige Stoffe, wie die Hormone, Co-Enzyme, Enzyme und Vitamine, sind makrochemischen Analysen selten zugänglich. Bei der immer dringlicher werdenden Aufgabe, die Verbreitung solcher Substanzen in Zellen und Geweben quantitativ festzulegen, sind wir also auf Mikromethoden angewiesen, sei es, daß wir wägen oder titrieren, sei es, daß wir uns kolorimetrischer oder anderer optischer Methoden bedienen.

Besonders aber für diejenige Arbeit, welche immer die grundlegende und abschließende der Biochemie bleiben wird, nämlich die analytische und strukturelle Identifizierung der an Stoff- und Kraftwechsel beteiligten Substanzen, wird man immer häufiger seine Zuflucht zur Mikro-Elementaranalyse nehmen müssen, welche F. Pregl der Chemie und damit auch der Biologie geschenkt hat.

Als kleinen Beitrag zu der Fritz Pregl gewidmeten Festschrift wollen wir Erfahrungen und Ergebnisse über Kolorimetrie der Carotinoide mitteilen. Der Nachweis kleiner Mengen dieser Stoffe hat dadurch ein besonderes Interesse gewonnen, daß es sich neuerdings gezeigt hat[1]), daß Carotin, bezw. Carotinoide eng mit der A-Vitaminwirkung verknüpft sind.

[1]) B. u. H. v. Euler, Svensk Kem. Tidskr. *40*, 242; 1928 (Septemberheft). — B. u. H. v. Euler u. H. Hellström, Biochem. Zeitschr. 203, 370; 1928. — P. Karrer, B. u. H. v. Euler, Svenska Vet. Akad. Arkiv. f. Kemi, *10*, 2; 1928. — Helv. Chim. Acta, *12*, 278; 1929.

Vor etwa einem halben Jahr konnte durch Untersuchungen, welche wir in Gemeinschaft mit Herrn Prof. Dr. P. KARRER, Zürich, durchgeführt haben, gezeigt werden, daß Carotin, und zwar auch hochgereinigtes — das reinste, seither mit positivem Ergebnis geprüfte, unter Stickstoff aus Hexan umkristallisierte Präparat zeigte einen Schmelzpunkt von 182° — noch in Tagesdosen von 0,01 mg deutliche A-Vitaminwirkung an Ratten ausübt.

Kolorimetrie kleiner Carotinoidmengen.

Die Kolorimetrie bildet durch die Einfachheit und Schnelligkeit der Messungen ein ausgezeichnetes Hilfsmittel, wenn es gilt, kleine Mengen stark gefärbter oder stark färbbarer Substanzen zu untersuchen. Die Genauigkeit, welche man dabei erreichen kann, beruht in hohem Grad auf der Konstruktion des angewandten Kolorimeters und auf der Methode der Farbenbestimmung.

Will man zwei „Flächenhelligkeiten" vergleichen und auf gleiche Intensität einstellen, so kann dies mit um so größerer Genauigkeit geschehen, je größer die zu vergleichenden Felder sind, je näher sie aneinander liegen und je länger ihre Grenzlinie ist. Die erste und letzte dieser drei Bedingungen sind im allgemeinen in den meisten Kolorimetern gut erfüllt, während der gegenseitige Abstand der zu vergleichenden Felder, das heißt die Breite der Grenze je nach Konstruktion des Kolorimeters erheblich variieren kann. In den besten Typen, welche eine gute Optik besitzen, bringt man die Felder durch Spiegel oder Prismen verschiedener Konstruktion unmittelbar nebeneinander, während in einfacheren Konstruktionen der Abstand zwischen den beiden Feldern 1 bis 2 cm betragen kann.

Farben-, bezw. Intensitätsbestimmungen werden im allgemeinen in der Weise ausgeführt, daß von der auf ihre Konzentration zu untersuchenden Substanz eine Standardlösung hergestellt wird, welche man durch geeignete Verdünnung oder durch Veränderung der Schichtdicke auf die gleiche Farbstärke bringt wie die unbekannte Lösung. In diesem Fall wird nur die Gültigkeit des BEERschen Gesetzes vorausgesetzt und der Farbton wird für die beiden Lösungen ohne weiteres der gleiche, wenn die richtige Einstellung

erzielt ist; diese Einstellung kann dann noch weiter verbessert werden. Der Unterschied im Farbenton kann nämlich erhöht werden durch Einschaltung geeigneter Lichtfilter.

Nicht selten erweist es sich indessen schwer oder unmöglich, eine Standardlösung aus der zu prüfenden Substanz herzustellen, nämlich besonders dann, wenn die Substanz nicht haltbar, beziehungsweise chemisch nicht stabil ist.

Dies ist z. B. der Fall bei den Verbindungen, welche entstehen, wenn man gewisse tierische Öle nach Carr und Price[2]) mit Antimontrichlorid in wasserfreiem Chloroform mischt. Die Anwendbarkeit der mit $SbCl_3$ auftretenden blauen Farbenreaktion zur Prüfung des A-Vitamingehaltes von Tranen wurde von der internationalen Hygieneorganisation des Völkerbundes diskutiert und von einem Subkomitee näher behandelt, welches zum Schluß kam, daß bei der Prüfung von Lebertranen auf ihren Gehalt an A-Vitamin die Untersuchungen mit der genannten kolorimetrischen Methode analoge Resultate ergeben, wie mit den biologischen Methoden.

Neuerdings wurde für die kolorimetrische $SbCl_3$-Methode dadurch ein fester Ausgangspunkt gewonnen, daß durch quantitative Messungen Carotin als kolorimetrischer Standard der $SbCl_3$-Reaktion festgelegt wurde. Mit Carotin als Standard wurden dann andere Carotinoide nach rationellen Einheiten erstmalig gemessen.

Macht die Herstellung von Standardlösungen Schwierigkeiten, so kann man Farbenfilter mit steigender Farbenintensität benützen und für diese eine beliebige Einheit wählen. Die wesentlichste Schwierigkeit ist hierbei die, daß man den Farbenton nicht immer mit der zu messenden Lösung in Übereinstimmung bringen kann. Die verschiedenen Filterserien müssen in ihrem, resp. Spektralgebiet annähernd homogene Absorption besitzen und dürfen nicht in mehreren, weit voneinander getrennten, Spektralgebieten absorbieren.

Den von uns bei vorliegenden Messungen angewandten Kolorimeter haben wir erhalten durch Komplettierung eines sogenannten

[2]) Carr u. Price, Biochem. Journ. 20, 497; 1926. — Spektrophotometrische Untersuchung von Euler, Myrbäck, Fink u. Hellström, Zeitschr. f. physiol. Chem. 168, 177; 1927.

HÜFNER-Prismas, indem wir dieses teils mit einem Okular und teils mit einem Behälter für Filtra und Absorptionsgefäß versehen haben. Mittels des HÜFNER-Prismas bringt man die beiden Lichtbündel, welche verglichen werden sollen, miteinander in Kontakt, so daß das Gesichtsfeld im Okular in zwei durch eine äußerst schmale Linie geschiedene Hälften geteilt erscheint, von denen die eine von dem aus der Lösung gehenden Licht herstammt, die andere von dem durch die Filtra gegangenen Licht. Unmittelbar vor dem Okular ist eine Öffnung, wo ein Farbenfilter angebracht werden kann, um die Einstellung nach oben angedeutetem Effekt zu erleichtern. Als Farbenfilter haben wir Gläser nach LOVIBOND

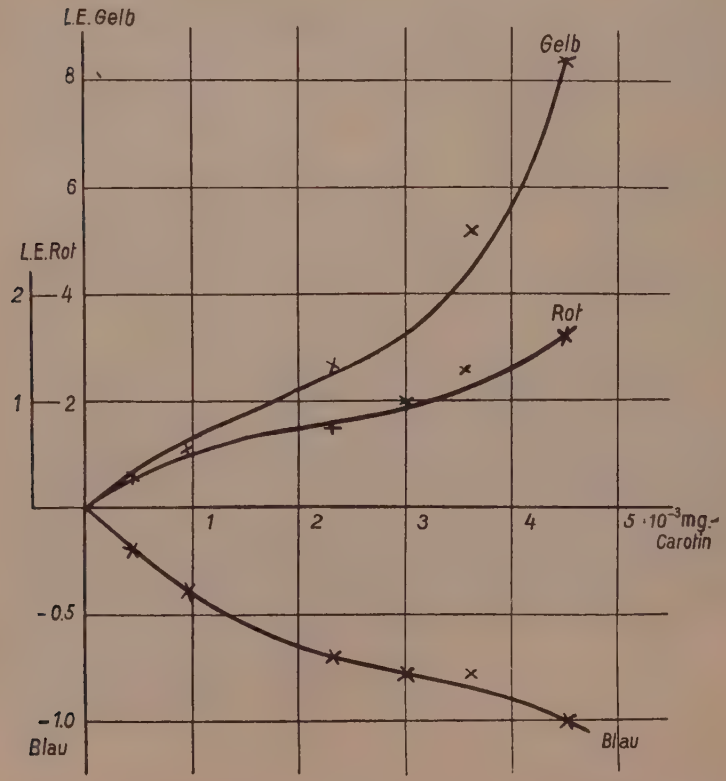


Fig. 1.

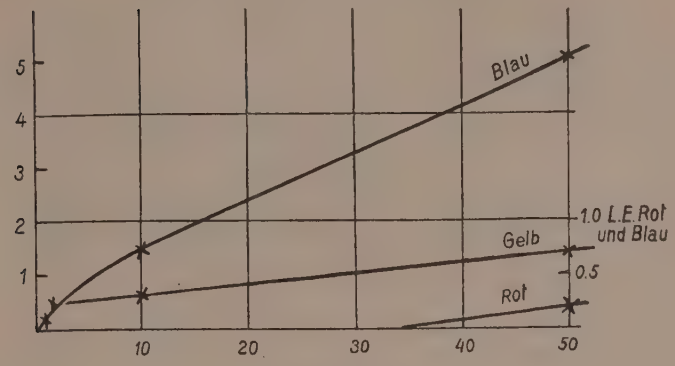


Fig. 2.

Lovibond-Einheiten, blau.

10^{-3} mg Dihydro-α-crocetin-methylester.

verwendet, welche von der Firma Tintometer Ltd., Salisbury, geliefert werden. Die Farbstärke unserer Gläser ist in LOVIBOND-Einheiten (L. E.) ausgedrückt; jede Serie enthält 19 Filtra von steigender Farbstärke, nämlich Zehntel- von 0,1 bis 0,9 und ganze LOVIBOND-Einheiten von 1 bis 10.

Die Fig. 1 zeigt eine Standardkurve für Carotin; als Ordinate sind LOVIBOND-Einheiten aufgetragen, als Abcisse mg Carotin.

Da die Absorptionsmaxima der angewandten Farbenfiltra nicht mit denen des Carotins zusammenfallen, müssen gelbe Filtra mit roten kombiniert werden, damit der Farbenton der gleiche wird. Dabei absorbiert das rote Filter einen großen Teil vom grünen Gebiet des Spektrums, was wiederum nicht in anderer Weise ausgeglichen werden kann als durch Einschalten blauer Filtra vor das Absorptionsgefäß. Die Wirkung der verschiedenen Filtra geht deutlich aus der Fig. 1 hervor. Die Kurve für das gelbe Filtrum zeigt durch ihr kräftiges Ansteigen, daß dies die Hauptabsorption repräsentiert, während die beiden anderen Kurven wegen der relativ niedrigen Werte, welche sie enthalten, als Farbenkorrektionen betrachtet werden können. Die Kurve für Blaufilter ist in der Figur negativ gezeichnet, um damit anzudeuten, daß Blaufilter vor die zu messende Probe gestellt wurden, also nicht vor die übrigen Filtra. Die Figur zeigt dadurch deutlich die Funktion des blauen Filters als Kompensation gegen das rote.

Tabelle I

Carotin

Konz. mg/ccm	Lovibond-Einheiten		
	Gelb	Rot	Blau
10^{-3}			
4,5	8,4	1,6	1,0
3,6	5,2	1,3	0,9
3,0	3,2	1,0	0,8
2,3	2,7	0,7	0,7
0,9	1,1	0,5	0,4
0,45	0,6	0,3	0,2

Tabelle II

Dihydro-α-crocetin-methylester, 0,2ccm davon mit 1,8ccm $SbCl_3$ zusammengebracht, gibt:

Konz. mg/ccm	Lovibond-Einheiten					
	unmittelbar			zum Schluß		
	Gelb	Rot	Blau	Gelb	Rot	Blau
10^{-3}						
50	0,7	0,2	5,0	1,0	1,8	—
10	0,3	—	1,5	0,2	0,9	—
3	0,2	—	0,5	0,2	0,2	—
1,5	0,2	—	0,2	—	—	—

Die Tabelle I enthält die für Carotin (KARRER) bei verschiedenen Verdünnungen erhaltenen Werte. Noch bei einer Konzentration von 0,00045 mg/ccm ist die gelbe Farbe meßbar.

In diesem Fall bringt also die kolorimetrische Bestimmung durch die $SbCl_3$-Reaktion keinen wesentlichen Vorteil gegenüber der Messung am reinen Carotin.

Die Tabelle II gibt die Resultate einer Konzentrationsbestimmung eines anderen Carotinoides, nämlich des Dihydro-α-crocetin-methylesters, mittels der $SbCl_3$-Reaktion wieder. Das reine Carotinoid ist nur schwach gelb gefärbt, gibt aber mit $SbCl_3$ eine starke Blaufärbung, welche gestattet, Konzentrationen bis herunter zu 0,0015 mg/ccm zu schätzen. Siehe auch Fig. 2.

Die Chlorformlösungen sowohl des Antimontrichlorides als des Carotinoides müssen bei diesen Bestimmungen sorgfältigst vor jeder Spur von Feuchtigkeit geschützt werden, da die kleinste Wassermenge, und sogar eine hohe Luftfeuchtigkeit, bedeutende Fehler in der Konzentrationsbestimmung herbeiführt.

Die sofort eintretende Blaufärbung geht innerhalb sehr kurzer Zeit (10 Sekunden) in einen roten Ton über und nach etwa zwei Minuten ist die Lösung konstant rot. Man muß deshalb die kolorimetrische Bestimmung in der Weise ausführen, daß man mit verschiedenen vorbereitenden Proben eine immer genauere Annähe-

rung an die zu messende Farbe erzielt und schließlich in wenigen Sekunden die Messung der sofort eintretenden Blaufärbung ausführen kann. Die Tabelle II enthält teils diese sofort auftretende, vorübergehende blaue Farbe, teils die später eintretende konstante rote Farbe.

Fehlerberechnung.

Wenn die Stärke der Komplementärfarbe $\bar{J}$ als die relative Intensität dieser Farbe zu derjenigen der absorbierten Farbe J definiert wird, bekommt man: $\bar{J} = a.\frac{\bar{J}_0}{J}$, wo a ein Proportionalitätsfaktor und $\bar{J}_0$ die wirkliche Intensität der Komplementärfarbe ist. Wird die Stärke der Komplementärfarbe J gleich 1 definiert, wenn sie mit der ursprünglichen Intensität J_0 der absorbierten Farbe weißes Licht erzeugt, so wird[3])

$$1 = a.\frac{\bar{J}_0}{J_0} \text{ und } a = \frac{J_0}{\bar{J}_0}.$$

Man bekommt folglich: $\bar{J} = \frac{J_0}{J}$. Dem Absorptionsgesetz gemäß ist die Konzentration einer absorbierenden Lösung proportional dem Log $\frac{J_0}{J}$, folglich auch dem Logarithmus der oben definierten Farbstärke: Konz. $= k \,.\log \bar{J}$.

Der Fehler der Konzentrationsbestimmung ergibt sich durch Differentiation der letzten Gleichung: $dc = k \cdot \frac{d\bar{J}}{\bar{J}}$ und der prozentuale Fehler $\frac{dc}{c} = \frac{1}{\text{Log}\,\bar{J}} \cdot \frac{d\bar{J}}{\bar{J}}$. Infolge des Weber-Fechner'schen Gesetzes ist $\frac{d\bar{J}}{\bar{J}}$ konstant und nur von den früher oben genannten Faktoren der Kolorimeterkonstruktion abhängig.

Weil wir Lovibond-Einheiten verwenden, deren Farbstärken in einer willkürlichen Einheit angegeben sind und außerdem gewöhnlich mehrere verschiedene Farbenfilter verwendet werden müssen, wird die Beziehung zwischen den Lovibond-Einheiten (x) und der Konzentration c von der allgemeinen Form

$$c = f(x) \text{ und der Fehler } \triangle c = f'(x)\ \triangle x.$$

[3]) Aus dieser Definition wird auch ersichtlich, daß man immer dieselbe konstante Lichtquelle verwenden muß, um die gleiche Farbstärke zu erhalten.

$\triangle x$ wird für das gemessene Intervall zu 0,1 bis 0,2 L. E. geschätzt. f'(x) wird experimentell aus der Kurve als der Winkelkoeffizient ermittelt. Jede Kurve gibt einen Beitrag zum Fehler, den wir bezw. $\triangle c_g$, $\triangle c_r$, $\triangle c_b$ nennen. Der gesamte Fehler beträgt dann: $\triangle c = \sqrt{\triangle c_g^2 + \triangle c_r^2 + \triangle c_b^2}$. $\triangle c$ ergibt sich für Carotin nach folgender Zusammenstellung:

c	f'(x)			f'(x)$\triangle$x[4])			
10^{-3}	Gelb	Rot	Blau	$\triangle c_g$	$\triangle c_r$	$\triangle c_b$	$\triangle c$
1	1	1,3	-3	0,1	0,1	0,3	0,3
2	1	3	-5,8	0,1	0,3	0,6	0,7
3	0,8	1,8	-9	0,1	0,2	0,9	0,9
4	0,3	1	-7	0,03	0,1	0,7	0,8

In der Tat sind die Fehler jedoch kleiner als die hier angegebenen, da, wie oben erwähnt, die Kurven für rot und blau nur Korrektionen sind.

[4]) Berechnet für $\triangle x = 0{,}1$ L. E.

Beiträge zur qualitativen Mikroanalyse von Säuren.

Von **F. Feigl** und **P. Krumholz.**

(Aus dem II. Chem. Univ.-Institut, Wien.)

(Eingelangt am 28. Juni 1929.)

Von dem Gesichtspunkt aus betrachtet, daß für den mikrochemischen Nachweis eines Stoffes lediglich die zu erreichende Erfassungsgrenze und nicht etwa eine bestimmte Ausführungsart maßgebend ist[1]), dürfen die nachstehend beschriebenen Säurenachweise als mikrochemische bezeichnet werden. Es handelt sich bei diesen um die analytische Auswertung von Reaktionen, welche, abgesehen von einer niedrigen Erfassungsgrenze und hohen Empfindlichkeit, von bemerkenswerter Spezifität sind und deshalb eine Aufnahme unter die Methoden der qualitativen Mikroanalyse rechtfertigen.

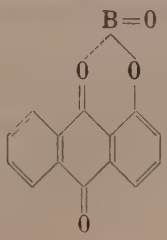
I. Borsäure.

Es ist bekannt, daß die farbigen Lösungen gewisser Oxyanthrachinone in konz. H_2SO_4 durch Zusatz von Borsäure einen Farbumschlag erfahren, was zum Nachweis von Oxyanthrachinonen verwertet wird[1a]). Es war daher naheliegend, zu versuchen, ob diese Farbreaktion zu einem Nachweis der Borsäure geeignet ist. Zunächst wurden mit zahlreichen Anthrachinonderivaten Versuche angestellt, um die Art und Intensität des durch Borsäure bewirkten Farbumschlages festzustellen. Die verdünnte Lösung der Verbindung in konz. H_2SO_4 wurde mit einer Messerspitze Borax versetzt, schwach erwärmt und mit einer reinen Farbstofflösung gleicher Konzentration verglichen. Die Resultate sind in nachstehender Tabelle enthalten:

[1]) F. Feigl, Mikrochemie I, 4, 1923.

[1a]) I. Houben, Das Anthracen und die Anthrachinone, Leipzig 1929, S. 343 Nähere Angaben konnten nicht gefunden werden.

Anthrachinonderivat[2])	Farbe in konz. Schwefelsäure	
	ohne B_2O_3	mit B_2O_3
1,-Oxyanthrachinon	gelb	orange
2,- „	rotgelb	rotgelb
1,2,-Dioxyanthrachinon	weinrot	violett
1,3,- „	gelb	gelb
1,4,- „	rot	gelb fluoreszierend
1,5,- „	rot	rotviolett
1,8,- „	rotgelb	rot
2,3,- „	braun	braun
2,6,- „	rot	rot
2,7,- „	rot	rot
1,2.- „ sulfosaures Na	rotgelb	rot
1,2,3,-Trioxyanthrachinon	braun	violettbraun
1,2,4,- „	orange	weinrot
1,4,5,8,-Tetraoxyanthrachinon	blau	blau
1,2,5,8,- „	violett	blau
1,-Aminoanthrachinon	grün	braun
1,2,-Diaminoanthrachinon	grün	braun

Wie aus obiger Tabelle hervorgeht, werden von den von uns untersuchten Oxyanthrachinonen mit Ausnahme des 1,3-Dioxy- und 1,4,5,8-Tetraoxyanthrachinons diejenigen durch Borsäure umgefärbt, welche eine Hydroxylgruppe in Orthostellung zu einer Carbonylgruppe besitzen. Dies ist wohl auf die Bildung innerkomplexer Borsäureester  zurückzuführen, wie solche von O. Dimroth und T. Faust[3]) durch Einwirkung von

[2]) Die überprüften Anthrachinonverbindungen wurden uns von J. G. Farbenindustrie A.-G. überlassen, wofür wir auch an dieser Stelle danken.

[3]) Ber. 54 (1921). 3020.

Boressigsäureanhydrid auf Oxy-(und Amino-)anthrachinone dargestellt worden sind, in welcher die OH-Gruppe der CO-Gruppe benachbart ist.

Wir bemerken hierzu noch, daß die schwach gelbe Fluoreszenz von Chinizarin und konz. H_2SO_4 durch geringe Borsäuremengen wesentlich verstärkt wird. Von allen untersuchten Anthrachinonderivaten ist die durch Borsäure bewirkte Umfärbung am intensivsten beim Chinalizarin (1,2,5,8-Tetraoxyanthrachinon), weniger deutlich beim Purpurin (1,2,4-Trioxyanthrachinon) und bei Alizarin S (1,2-Dioxyanthrachinon-sulfosaures-Na).

Die letztgenannten Oxyanthrachinone können daher zum Nachweis von Borsäure verwendet werden.

1. Nachweis mittels Chinalizarin.

In einer kleinen Eprouvette aus Jenaer Glas wird 1 ccm konz. H_2SO_4 mit 1 Tropfen der Probelösung und 1 bis 2 Tropfen einer 0,01%-Lösung von Chinalizarin in konz. H_2SO_4 versetzt, hierauf schwach erwärmt und die Färbung mit einem Blindversuch verglichen. Bei ganz geringen Borsäuremengen tritt ein deutlicher Farbumschlag erst nach einigen Minuten auf.

Erfassungsgrenze: 0,2 μg Borsäure entsprechend 0,06 μg Bor.

2. Nachweis mittels Purpurin oder Alizarin S.

Die Durchführung des Nachweises ist dieselbe wie beim Chinalizarin, es sind lediglich stärkere Farbstofflösungen zu verwenden, und zwar eine 0,05%-Lösung von Purpurin, bezw. eine 0,2%-Lösung von Alizarin S.

Die Erfassungsgrenze ist beim Purpurin: 0,6 μg Bor.

Die Erfassungsgrenze ist beim Alizarin S: 1 μg Bor.

Der vorstehend beschriebene Nachweis wird nur durch Nitrate, größere Mengen von Arseniten, oxydierende Säuren (Chromsäure, Ferricyanwasserstoffsäure usw.) und Fluoride gestört. Nitrate bewirken beim Chinalizarin eine Blaufärbung, bei den anderen Farbstoffen eine Gelbfärbung. Die oxydierenden Säuren entfärben die Farbstofflösungen wahrscheinlich durch oxydative Aufspaltung.

Metallsalze setzen die Empfindlichkeit des Nachweises nur unbedeutend herab. Der Nachweis kann auch mit festen Substanzen ausgeführt werden, wobei durch vorhergehendes Abglühen die Beeinflussung durch Nitrate, Ferricyanide usw. ausgeschlossen werden kann.

In borsäurehaltigen Gesteinen (z. B. im Datolit) konnte das Bor unter Verwendung einiger Milligramme der festen Probe eindeutig nachgewiesen werden.

Gegenüber den bekannten Nachweisen der Borsäure mittels der Ester- oder der Curcuminreaktion besitzt obiger Nachweis den Vorteil großer Einfachheit und Spezifität bei einer Erfassungsgrenze, die als mikrochemische bezeichnet werden kann.

II. Chromsäure*).

Für den Nachweis von Chromsäure ist schon vor längerer Zeit von P. Cazeneuve die Umsetzung mit Diphenylcarbazid[4]) empfohlen worden; dieselbe führt zu löslichen, intensiv rotvioletten Reaktionsprodukten, deren Natur bisher noch nicht aufgeklärt ist. N. M. Stover[5]) hat neuerdings die Empfindlichkeit des Chromat-Diphenylcarbazidnachweises mit 1: 100,000.000 bis 250,000.000 bestimmt; es handelt sich demnach um eine Reaktion, die jedenfalls als mikrochemisch zu bezeichnen ist. Ein Nachteil für die Verwendung dieses empfindlichen CrO_4''- (bezw. $Cr^{\cdots}$) Nachweises war bisher ihre nicht strenge Spezifität, da bekanntlich sowohl Quecksilbersalze als auch Molybdate mit Diphenylcarbazid gleichfalls Farbreaktionen liefern. Die Störung durch Hg-Salze und Molybdate läßt sich nun beseitigen, wenn man durch geeignete Zusätze die Konzentration der $Hg^{\cdots}$-, bezw. MoO_4''-Ionen so weitgehend herabsetzt, daß die zum Eintritt der Farbreaktion erforderlichen Ionenkonzentrationen nicht mehr erreicht werden. Bei Quecksilbersalzen gelingt dies durch Zusatz von überschüssigem Alkalichlorid oder -bromid, wodurch die geringe Dissoziation von $HgCl_2$, bezw. $HgBr_2$ noch eine weitere Zurückdrängung durch das im Überschuß vorhandene Halogenion erfahren kann. (Bei größerem Cl'-, bezw. Br'-Zusatz wäre auch Bildung der komplexen Anionen $[HgCl_4]''$, bezw. $[HgBr_4]''$ in Erwägung zu ziehen.)

In einer Lösung, die 0,02 g Hg (als Nitrat) enthält, bleibt nach Zusatz von 0,012 g NaCl die Diphenylcarbazidreaktion aus, während die Chromatreaktion noch bei Anwesenheit von 0,06 g Hg und 0,04 g NaCl eine Erfassungsgrenze von 0,3 μg CrO_3 in

*) Die nachfolgenden Angaben sind der Dissertationsarbeit von Herrn K. Weisselberg entnommen.

[4]) P. Cazeneuve, Bull. Soc. chim. [3] 23. (1900), 701; C. B. 1900. II. 689.

[5]) Journ. Am. Chem. *50*. 2363 (1928). C. 1928. II. 2174.

1 ccm besitzt. Es läßt sich demnach diese CrO_3-Menge noch neben der 200.000fachen Menge Quecksilber deutlich erkennen.

Zur Ausschaltung der Störung der CrO_4''-Reaktion mit Diphenylcarbazid durch anwesendes MoO_4''-Ion bietet die leichte Bildung von komplexen Molybdänoxalsäureverbindungen eine bequeme Handhabe, durch welche, wie vor kurzem an anderer Stelle gezeigt wurde[6]), die MoO_4''-Ionenkonzentration eine solche Verringerung erfährt, daß die Reaktion mit Phosphorsäure sowie andere Molybdatreaktionen ausbleiben.

Wir fanden, daß durch Zusatz von 0.06 g Oxalsäure die Reaktion von 0,05 g MoO_3 mit Diphenylcarbazid ausbleibt, bezw. die schon erfolgte Farbreaktion zum Verschwinden gebracht werden kann. Es empfiehlt sich jedoch, den Oxalsäurezusatz vor Zugabe des Diphenylcarbazids vorzunehmen, da ansonsten keine völlige Entfärbung eintritt, sondern Blaufärbungen entstehen, die davon herrühren, daß es sich bei der Reaktion zwischen Molybdansäure und Diphenylcarbazid um eine gleichzeitige teilweise Reduktion der Molybdänsäure und Oxydation des Diphenylcarbazids handelt[7]).

Es konnten in einem Volumen von 1 ccm nach Zusatz von 0.022 g Oxalsäure noch 0.5 μg CrO_3 neben 0.016 g MO_3 nachgewiesen werden, was einem Verhältnis 1 : 32.000 entspricht. Bemerkt sei, daß die Empfindlichkeit des Chromatnachweises mittels Diphenylcarbazid durch Oxalsäurezusatz zwar herabgesetzt wird, die erreichbare Erfassungsgrenze aber trotzdem als eine mikrochemische zu bezeichnen ist.

Die Chromsäure-Diphenylcarbazidreaktion läßt sich durch Ausschütteln mit Chloroform empfindlicher gestalten; dieser Vorgang zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit ist jedoch bei Anwesenheit von Quecksilber oder Molybdansäure nicht statthaft. Wir fanden nämlich, daß Cl'-haltige Hg-Lösungen, die auf Zusatz von Diphenylcarbazid farblos bleiben, beim Umschütteln mit Chloroform eine rotviolette Chloroformschicht liefern; das gleiche gilt,

---

[6]) F. Feigl, Z. anal. Ch. *74* (1928), 389; F. Feigl und P. Krumholz, Ber. *62* (1929), 1138.

[7]) Herr K. Weisselberg hat eine Verbindung isoliert, nach deren Zusammensetzung und Darstellung die Formel $MoO_3 . 2Dco$ wahrscheinlich ist. Dco = Diphenylcarbazon (ein Oxydationsprodukt des Diphenylcarbazids) $OC\begin{matrix}/N = N\,C_6H_5\\ \backslash NH—NH\,C_6H_5\end{matrix}$

wenn auch in weniger deutlicher Form, von Molybdansäure-, Oxalsäure-Diphenylcarbazidlösungen.

III. Kieselsäure.

Vor kurzem wurde an anderer Stelle darauf hingewiesen[8]), daß die duch Komplexbildung mit Kieselsäure bewirkte Reaktionserhöhung des Molybdäntrioxyds zu einem empfindlichen Nachweis von Silikaten und Fluoriden verwendet werden kann.

Durch die koordinative Bindung in der aus löslicher Kieselsäure und salpetersaurer Ammonmolybdatlösung leicht entstehenden Silicomolybdänsäure ($H_4SiO_4 \cdot 12\,MoO_3 \cdot aq$) wird das Molybdäntrioxyd befähigt, bei geringer Azidität Benzidin zu oxydieren, wobei durch das gleichzeitig entstehende Molybdän- und Benzidinblau eine hohe Empfindlichkeit des Nachweises erreicht wird.

Die bereits angeführte niedere Erfassungsgrenze dieses Nachweises kann durch nachstehende Ausführung noch bedeutend verringert werden:

In einem Mikrotiegel aus Berliner oder Rosenthal-Porzellan wird 1 bis 2 Tropfen der schwach sauren Probelösung (die Azidität soll nicht mehr als n 5 bis n/10 betragen) mit 1 Tropfen einer Molybdatlösung (hergestellt durch Auflösen von 15 g Ammonmolybdat in 300 ccm Wasser und Eingießen in 100 ccm Salpetersäure, d = 1,2) versetzt und über einen Mikrobrenner kurz erwärmt, wobei die Flüssigkeit nicht aufsieden soll, um ein eventuelles Herauslösen von Kieselsäure aus dem Tiegel zu vermeiden.

Nach dem Erkalten des Tiegels wird 1 Tropfen einer Lösung von 0,25 g Benzidin in 100 ccm 10%iger Essigsäure und einige Tropfen einer gesättigten Natriumazetatlösung zugefügt. Es entsteht eine Blaufärbung, durch welche noch 0,1 μg SiO_2 deutlich zu erkennen sind. Da die Porzellantiegel zuweilen Spuren von Kieselsäure abgeben können, empfiehlt es sich, immer einen Parallelversuch mit 1 Tropfen reinen Wassers anzustellen.

Arsensäure und größere Mengen Phosphorsäure wirken naturgemäß störend, da der Nachweis auf der Reaktionsfähigkeit des in den Heteropolysäuren des Arsens, Phosphors und Siliciums koordinierten Molybdäntrioxyds beruht. Kleine Phosphorsäuremengen können durch Zusatz eines Tropfens verdünnter Oxalsäurelösung

[8]) F. Feigl und P. Krumholz, Ber. *62* (1929), 1138.

nach erfolgter Erwärmung mit Molybdat unschädlich gemacht werden. Der Kieselsäurenachweis läßt sich auch als Tüpfelreaktion auf dem Filtrierpapier ausführen, wobei allerdings die Empfindlichkeit des Nachweises verringert wird:

Auf ein quantitatives Filtrierpapier wird ein Tropfen der Probelösung und hierauf ein Tropfen der Molybatlösung aufgebracht und über einer kleinen Flamme bis zum Eindunsten der Flüssigkeit erwärmt; hierauf wird mit einem Tropfen der essigsauren Benzidinlösung angetüpfelt und über eine offene Ammoniakflasche gehalten. 1 μg SiO_2 geben deutliche Blaufärbung. Dieser Kieselsäurenachweis ist bei Abwesenheit von Phosphor- und Arsensäure sowie von Oxydationsmitteln eindeutig.

IV. Flußsäure.

Für den Nachweis von Fluoriden haben wir an anderer Stelle[9]) ein Verfahren angegeben, welches darauf beruht, aus Fluoriden Fluorwasserstoff zu entwickeln, diesen in bekannter Weise mit SiO_2 in Umsetzung zu bringen, wobei flüchtiges SiF_4 entsteht, das durch Wasser verseifbar ist. Die hierbei entstehende lösliche Kieselsäure sowie die gebildete Kieselfluorwasserstoffsäure lassen sich nach der unter III. angegebenen Methode nachweisen.

Die bei diesen Vorgängen verlaufenden Umsetzungen sind:

$$MeF_2 + H_2SO_4 = MeSO_4 + 2HF$$
$$SiO_2 + 4HF = SiF_4 + 4H_2O$$
$$3SiF_4 + 4H_2O = H_4SiO_4 + 2H_2[SiF_6]$$

Für die mikrochemische Anwendung dieses Flußsäurenachweises hat sich die Verwendung eines einfachen kleinen Apparates[10]) als sehr brauchbar erwiesen, der nachstehend abgebildet ist.

Das in der Glashülse aus der Probe, Quarzsand[11]) und konz. H_2SO_4, entwickelte SiF_4 wird, ohne daß Verluste entstehen können, weitgehend durch den am Dorne des Verschlußstückes hängenden Wassertropfen aufgefangen und verseift.

Ausführung des Nachweises:

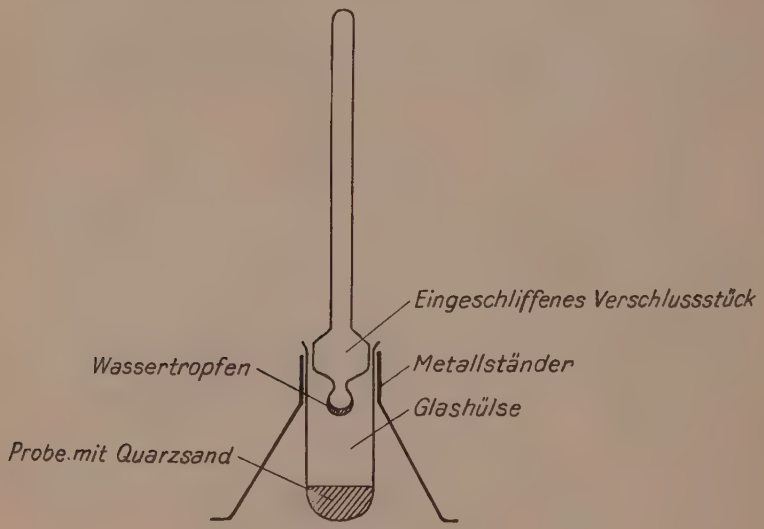
Die mit reinstem Quarzsand vermischte feste Probe wird in die

[9]) F. Feigl und P. Krumholz, Ber. *62* (1929), 1138.

[10]) Erhältlich bei der Firma Paul Haack, Wien, IX.

[11]) Seesand enthält zuweilen beträchtliche Fluormengen und muß durch Erhitzen mit konz. H_2SO_4 gereinigt werden.

Glashülse des Apparates gebracht, mit 1 bis 2 Tropfen konz. H_2SO_4 durchfeuchtet, das Verschlußstück mit einem daranhängenden Wassertropfen aufgesetzt, zirka eine Minute gelinde erwärmt und nach Entfernung der Flamme noch 3 bis 5 Minuten stehengelassen. Der am Dorn des Verschlußstückes hängende Tropfen wird hierauf mit Hilfe einer Kappilarpipette in einen Mikrotiegel gespült und die Lösung, wie unter III angegeben, auf Kieselsäure geprüft.



Die Erfassungsgrenze für reine Fluoride beträgt 1 μg Fluor.

In den nachstehend angeführten Gesteinsproben konnte das Fluor bei Verwendung von maximal 0,1 g Substanz nachgewiesen werden.

1. Abgeglühte Zinkblende mit zirka . . . . . 1,50% F
2. Abgeglühte Zinkblende mit zirka . . . . . 0,90% F
3. Abgeglühte Zinkblende mit zirka . . . . . 0,60% F
4. Anderitoid mit zirka . . . . . 0,06% F
5. Oranitgneis mit zirka . . . . . 0,02% F
6. Fleckamphybolit mit zirka . . . . . 0,01% F

Bei den drei letztangeführten Gesteinen[12]) wurde der Fluorgehalt aus den Phosphorgehalten errechnet, die von den in den Gesteinen enthaltenen Apatiteinschlüssen herrühren. Die P_2O_5-Gehalte waren 0,61, 0,2 und 0,1% P_2O_5. Karbonat- und sulfidhaltige Proben müssen vor Anstellung des Fluornachweises abgeglüht werden, um Entwicklung von CO_2 und Störung durch Bildung von H_2S, bezw. SO_2 zu vermeiden. Jodide und Bromide stören insoferne, als bei der Behandlung freies Halogen gebildet wird, welches im Wassertropfen aufgefangen, bei weiterer Behandlung Benzidin unter Blaufärbung oxydiert; es empfiehlt sich daher, falls Halogenide[13]) vorliegen, diese (erforderlichenfalls nach Aufschluß der festen Probe) durch Fällung mit Ag_2SO_4 zu entfernen. Größere Nitratmengen wirken ebenfalls störend, da die mit konz. H_2SO_4 daraus freigemachte Salpetersäure sich in dem Wassertropfen anreichert und bei der weiteren Behandlung das Benzidin unter Gelbfärbung zersetzt.

Bei Anwesenheit von Nitraten ist daher die feste Probe, beziehungsweise der Abdampfrückstand abzuglühen.

Sind Lösungen auf einen etwaigen Fluorgehalt zu prüfen, so werden kleine Mengen derselben (erforderlichenfalls nach Fällung mit Ag_2SO_4) auf Quarzsand eingedunstet und der Trockenrückstand in der beschriebenen Weise weiter behandelt.

Gemäß der niederen Erfassungsgrenze des Fluornachweises war anzunehmen, daß beispielsweise bei Mineralwässern noch ein Gehalt von zirka 0,0001% Fluor sich nach Abdunsten einiger ccm leicht erkennen lassen müsse.

Wir untersuchten einige natürliche Mineralwässer und gingen dabei so vor, daß wir 5 ccm des Wassers in einem kleinen Porzellanschälchen unter Zusatz einer Messerspitze Quarzsand eindunsten ließen, hierauf den Trockenrückstand in die Glashülse des oben beschriebenen Apparates brachten und, wie schon erwähnt, weiterbehandelten. Von Mineralwässern, welche größere Mengen von Chloriden, bezw. Jodide enthielten, wurden je 5 ccm mit einer heiß gesättigten Ag_2SO_4-Lösung versetzt, das entstandene Silberhalogenid abfiltriert und das Filtrat mit Quarzsand eingedunstet.

[12]) Die analysierten Gesteinsproben wurden uns von Herrn Prof. Dr. H. Leitmeier überlassen, wofür wir an dieser Stelle danken.

[13]) Auch größere Mengen von Chloriden müssen entfernt werden, um ein Überschäumen durch Bildung von HCl beim Erwärmen mit H_2SO_4 zu vermeiden.

Art des Mineralwassers	Ergebnis des F-Nachweises
Biliner Sauerbrunn (Brunnendirektion Bilin) .	deutlich positiv
Karlsbader Sprudel	deutlich positiv
Mattonis Gießhübler (H. Mattoni A.-G.) . .	schwach positiv
Tassilo-Quelle (Bad Hall)	negativ
Ober-Selters Mineralbrunnen	negativ
Hunyadi-Janos-Bitterwasser (A. Saxlehner, Budapest)	negativ
Levico-Arsen-Eisenwasser	negativ

Nach der Empfindlichkeit des Fluornachweises errechnet, darf demnach angenommen werden, daß bei den unter 4 bis 7 angeführten Mineralwässern der Fluorgehalt (falls ein solcher überhaupt vorhanden) zweifellos weit unter 0,0001% F liegen muß.

Der von uns beschriebene Fluornachweis in festen Proben erfordert zu seiner Durchführung etwa 6 Minuten; wird hierzu auch noch die für das Abdunsten von Flüssigkeiten notwendige Zeit gerechnet, so ergibt sich trotzdem eine Schnelligkeit des Nachweises, welche bei anderen bisher üblichen Fluornachweisen nicht erreicht werden kann, ganz abgesehen von der geringen Menge des Probematerials, die für unseren mikrochemischen Nachweis benötigt wird.

Verbesserte Darstellung des Grignard-Reagens zur Mikrobestimmung von OH-Gruppen nach Tschugaeff und Zerewitinoff.

Von **B. Flaschenträger.**

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingelangt am 9. Juli 1929.)

Das GRIGNARD-Reagens[1]) wird jetzt mit verbesserter Methodik nach dreijähriger Erfahrung folgendermaßen hergestellt: In einem durch Erwärmen und Aussaugen getrockneten langhalsigen Jenaer-Rundkolben von 150 bis 200 ccm Inhalt werden 5 g trockene Magnesiumspäne (KAHLBAUM oder MERCK, „Magnesium für Feuerwerk") mit 65 ccm Iso-Amyläther (pro Analysi MERCK) übergossen, dann 15 ccm helles Methyljodid (KAHLBAUM oder MERCK) und ein Körnchen Jod — alles im Zustand der Lieferung, das heißt also nicht besonders getrocknet oder fraktioniert — dazugegeben. Das Zusammenbringen obiger Substanzen muß rasch geschehen. Der Kolben wird mit einem trockenen Rückflußkühler versehen und nachdem die erste Reaktion eingetreten ist, in kaltes Wasser getaucht. Es ist sehr wesentlich, daß die Reaktion nicht zu stürmisch einsetzt, da sonst das leichtsiedende Methyljodid (S. P. 45°) abdestilliert. Sollte das wirklich einmal vorkommen, dann wird erneut Methyljodid zugesetzt und durch späteres Verdünnen mit Amyläther eine zu hohe Konzentration an GRIGNARD-Reagens ausgeglichen. Die erste Reaktion ist nach etwa in einer halben bis einer Stunde abgeklungen. Wir lassen dann gewöhnlich über Nacht stehen; den Kühler verschließen wir mit einem Phosphorpentoxydrohr. Am nächsten Tag wird eine Stunde am Rückfluß erwärmt. Dies geschieht anfänglich vorsichtig. Dann erhitzen wir am absteigenden Kühler eine halbe Stunde lang auf stark siedendem Wasserbad. Dabei gehen Ströme von Jodmethyl weg. Auch wenn man eine Stunde in einem Wasserbad von 80° erhitzt, kann man das Jodmethyl nicht völlig entfernen. Denn bei weiterem Erhitzen auf siedendem Wasserbad läßt sich mit alkoholischer Silbernitratlösung noch sehr viel Jodmethyl im Destillat nachweisen. Zur Entfernung der letzten Spuren Jodmethyl schalten wir den

[1]) H. 146, 219, 1925.

noch heißen Kolben nach Abnahme des Kühlers direkt an die Wasserstrahlpumpe und evakuieren, bis sich im Manometer das übliche Vakuum von 12 bis 15 mm eingestellt hat, was etwa fünf Minuten dauert. Geringe Mengen von Amyläther gehen dabei weg. Daraufhin füllen wir die stark getrübte, noch warme GRIGNARD-Lösung in zwei Zentrifugengläser von etwa 50 ccm Fassungsvermögen. Diese verstopfen wir sofort mit entsprechend eingepaßten Korkstopfen und tarieren sie dann gegen mit Wasser und mit etwas Sand oder Kochsalz gefüllte Gläser aus. Inzwischen hat sich die Lösung auf etwa 40° abgekühlt. Es wird eine Stunde bei 3000 bis 4000 Touren zentrifugiert. Dabei setzt sich der Magnesiumschlamm ab und die Flüssigkeit wird klar. Eine kalte Lösung ist zu viskös für die Sedimentierung. Das fertige Reagens wird in einem Schuß in eine getrocknete, braune Kappenflasche (100 ccm) gekippt. Gerade der Luftabschluß ist für die Haltbarkeit der Lösung von ausschlaggebender Bedeutung[2]). Dann werden 2 ccm herauspipettiert, mit einfach normaler Salzsäure zerlegt und nach völligem Lösen des Magnesiumhydroxyds mit Natronlauge und Methylrot durch Zurücktitration die Normalität der Lösung ermittelt. Durch Hinzugabe von Amyläther wird eine Konzentration von 0,8 n eingestellt. Dieses Reagens hält sich nach unseren Erfahrungen mehrere Monate, wenn es luftdicht aufbewahrt wird. Dabei scheidet sich oft eine kristallisierte Verbindung aus, die sich beim Erwärmen der Flasche im Wasserbad leicht löst.

[2]) J. MEIRENHEIMER und W. SCHIBBENMAIER, B. 61, 2001, 1928.

Mikrobestimmung von Glyzerin in Fetten mit der Methode von Zeisel und Fanto.

Von **B. Flaschenträger.**

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Leipzig.)

(Eingelangt am 11. Juli 1929.)

Bisher gibt es keine geeignete Methode, um Glyzerin in kleinsten Mengen Fett quantitativ zu bestimmen. Die Oxydations- und Acetinmethoden[1]) verlangen alle eine vorausgehende Abtrennung des Glyzerins, die umständlich und wegen der zahlreichen Manipulationen und Wasserdampfflüchtigkeit des Glyzerins bei kleinsten Fettmengen nicht quantitativ sein können. 1912 haben WILLSTÄTTER und MADINAVEITA[2]) die Methoxylbestimmungsmethode von ZEISEL und FANTO[3]) zur direkten Glyzerinbestimmung in 0,15 bis 0,5 g Fett ausgebaut.

Unter Anwendung der Apparatur von NEUMANN[4]) zur Bestimmung von freiem Glyzerin und Beachtung einiger Fehlerquellen läßt sich das Glyzerin in kleinsten Fettmengen (20 mg) nach der WILLSTÄTTER'schen Methode mit hochkonzentrierter Jodwasserstoffsäure direkt als Isopropyljodid bestimmen.

1. Reagenzien. Man verwendet die Reagenzien nach PREGL zur Methoxylbestimmung. Vom roten Phosphor empfiehlt es sich, vor jeder Bestimmung das Wasser abzugießen und durch frisches, destilliertes Wasser zu ersetzen. Nach zwei bis drei Bestimmungen wird die P-Aufschwemmung erneuert. Die Jodwasserstoffsäure hat eine höhere Konzentration, $d = 1{,}96$, wie die zur Methoxylbestimmung und wird von KAHLBAUM reinst pro Analyse bezogen. Die Konzentration und Reinheit der Säure ist wesentlich für das Ergebnis. Andere Säure enthält nämlich oft flüchtige, silberfällende Verunreinigungen. H. MEYER[5])

[1]) A. GRÜN, Analyse der Fette und Wachse, Springer 1925, S. 209, und HOLDE, Kohlenwasserstoffe, Öle und Fette. Springer 1925, S. 648, und Einheitl. Untersuch. Meth. f. d. Fettindustr., Stuttgart 1927, S. 70.

[2]) B. 45, 2825, 1912.

[3]) Fres. 42, 549 und 579, 1903, Z. f. angew. Ch., 16, 413, 1903.

[4]) Z. f. angew. Chemie, Nr. 30, 1917, S. 234. Durch P. Haack, Wien, IX, Garelligasse, zu beziehen.

[5]) Z. f. angew. Chemie, 39, 717, 1926.

denkt an die Bildung von Cyansilber. Die Reagenzien sind deshalb vor Anwendung im Blindversuch zu prüfen.

2. Versuch. Man wägt soviel Glyzerin ein, daß man etwa 4 mg AgJ bekommt, also etwa 20 bis 50 mg. Öl wägt man am besten mit Kapillaren ein, wie zur Bestimmung des spezifischen Gewichtes[5]). Man pipettiert 1,5 ccm HJ (d = 1,96) und zwei bis drei Tropfen Essigsäureanhydrid in das Kölbchen, gibt zwei Siedesteine hinzu und dichtet den Schliff mit einem Tropfen Jodwasserstoffsäure. Dann gibt man 1,5 ccm P-Aufschwemmung und 30%ige Kadmiumsulfatlösung in den Aufsatz, dessen Schliff man mit Wasser dichtet. Hierauf legt man 5 ccm Silbernitratlösung vor, so daß die Kugel halb gefüllt ist. Das aus einem Kipp verwendete CO_2 wird mit kaltgesättigter Na-Carbonatlösung gewaschen und der CO_2-Strom vor der Füllung der Apparate mit dem Blasenzähler auf eine Blase in der $AgNO_3$-Lösung eingestellt. Es wird jetzt nochmals die Blasengeschwindigkeit geprüft, derart, daß eine Blase unten austritt, wenn die hochsteigende die Oberfläche der Ag-Lösung erreicht hat.

Jetzt erwärmt man das Reaktionskölbchen mit einem Becher Öl vorsichtig innerhalb von zehn bis zwölf Minuten auf 100° und dann in drei Minuten auf 112 bis 115°. Hier hält man die Temperatur für 20 bis 25 Minuten konstant, bis sich in der Silberlösung der Niederschlag zusammengeballt und abgesetzt hat. Man steigert dann langsam auf 135° und hält zehn Minuten die Temperatur. Damit ist Hydrolyse und Reduktion beendet. Das Einhalten der Temperatur ist für die völlige Umsetzung wesentlich. Man entfernt dann das Bad und läßt zehn Minuten abkühlen. Das CO_2 hat alles Isopropyljodid übergetrieben. Die Silberverbindung wird genau nach Pregl zerlegt und als AgJ gewogen.

Versuchsdauer zwei Stunden.

Triolein: $C_{57}H_{104}O_6$ Mol. G. 884, Ber. 10,4% Glyzerin.
17,34 mg Triolein gaben 4,61 mg AgJ, gef. 10,42% Glyzerin
21,30 „ „ „ 5,34 „ „ „ 9,83% „

Tristearin: $C_{57}H_{110}O_6$ Mol. G. 890, Ber. 10,33% Glyzerin.
20,46 mg Tristearin gaben 5,41 mg AgJ, gef. 10,37% Glyzerin
15,06 „ „ „ 3,95 „ „ „ 10,28% „

Über die quantitative mikroanalytische Bestimmung des Schwefels in organischen Substanzen auf maßanalytischem Wege.

Von **A. Friedrich.**

(Aus dem Institut für angewandte medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingelangt am 9. Juli 1929.)

Für die quantitative mikroanalytische Bestimmung des Schwefels in organischen Substanzen wurden von PREGL[1]) zwei Methoden geschaffen, die Bestimmung im Perlenrohr und die Mikromodifikation der Schwefelbestimmung nach CARIUS. In der Regel wird die Bestimmung im Perlenrohr vorgezogen, da die Zerstörung der Substanz durch Verbrennung unvergleichlich rascher vor sich geht als im Bombenrohr und gleichzeitig die volle Garantie für die restlose Zersetzung derselben gewährleistet ist.

Wie bekannt, wird bei dieser Bestimmung nach dem Prinzip der DENNSTEDT-Analyse die Substanz im Sauerstoffstrome verbrannt, die Verbrennungsgase über glühendes Platin geleitet und dann in einer verdünnten Perhydrollösung aufgefangen. Nach Beendigung der Verbrennung wird das Rohr gründlichst ausgespült, die vereinigten Waschwasser in einer großen Platinschale gesammelt, die Schwefelsäure mit Bariumchlorid gefällt, die Lösung eingeengt, der Niederschlag in einen gewogenen Mikro-Neubauer-Tiegel filtriert, geglüht, gewaschen und gewogen, dann neuerlich gewaschen, geglüht und gewogen, eventuell noch ein drittes Mal. Im Verhältnis zu den anderen Methoden der quantitativen organischen Mikroanalyse ist die Schwefelbestimmung eine der langwierigsten und in der experimentellen Durchführung eine der heikelsten Bestimmungen. Vor allem kann am Schlusse der Bestimmung beim Waschen des Bariumsulfatniederschlages durch zu langes oder zu kurzes Auswaschen ein Fehler entstehen. Da man die Menge des mitgerissenen Bariumchlorides nicht kennt, ist gründliches Auswaschen am Platze, anderseits macht sich in diesen kleinen Dimensionen die Löslichkeit des Bariumsulfats in Wasser schon stark geltend.

[1]) Die quantitative organische Mikroanalyse, Verlag Julius Springer, Berlin 1923.

Unvergleichlich rascher, einfacher und präziser gelingt die Schwefelbestimmung in stickstoff- und halogenfreien Substanzen. In diesem Falle wird nach PREGL[2]) das Perlrohr mit neutralisierter, verdünnter Perhydrollösung beschickt, nach Beendigung der Verbrennung das Rohr ausgespült und in den gesammelten Waschwässern die Schwefelsäure titriert. Diese Bestimmung ist infolge ihrer Einfachheit sehr genau, ein weiterer Vorteil ist die Präzision, die durch die klassische Methode der Maßanalyse an sich erreicht wird.

Die großen Vorzüge, welche diese Methode gegenüber der gravimetrischen Schwefelbestimmungen aufweist, ließen es erstrebenswert erscheinen, die maßanalytische Bestimmung des Schwefels in organischen Stoffen auch für stickstoff- und halogenhaltige Substanzen auszubauen.

Bei Verbrennung stickstoff- und halogenhaltiger Schwefelverbindungen entsteht neben Schwefelsäure gleichzeitig Salpetersäure, elementares Halogen und Halogenwasserstoff. Es handelt sich sonach hier um die Frage, die Schwefelsäure neben den anderen Säuren maßanalytisch zu bestimmen. Da es einen spezifischen Indikator für Schwefelsäure nicht gibt und auch jede theoretische Voraussetzung für einen solchen fehlt, kann die Lösung dieser Frage nur darin liegen, aus dem Gemisch der Säuren die Schwefelsäure zu trennen.

In erster Linie kommt die Trennung auf physikalischem Wege in Betracht, da die Schwefelsäure zum Unterschied von den übrigen Säuren nicht flüchtig ist. Experimentell ist die Trennung auf diesem Wege fast undurchführbar. Versucht man z. B. durch Wasserdampf die flüchtigen Säuren abzublasen, so dauert es ungemein lange, bis die letzten Reste übergehen, wenn dies praktisch überhaupt vollkommen erreicht werden kann. Es lassen sich somit hier keine Angaben machen, wie lange man destillieren muß, und gleichzeitig besteht die Gefahr des Verspritzens der Lösung.

Die zweite Möglichkeit, das Gemisch der Säuren in einer Quarzschale einzuengen und dann die flüchtigen Säuren abzurauchen, führt zu etwas besseren Ergebnissen. Hier ist zunächst zu beachten, daß ein Erhitzen über 130° hinaus nicht durchführbar ist, da die Schwefelsäure bei dieser Temperatur bereits Schwefeltrioxyd abgibt: es kommt sonach nur Wasserbadtempe-

[2]) l. c.

ratur in Betracht. Bei Versuchen, eine genau gemessene Menge verdünnter Schwefelsäure, mit Salzsäure oder Salpetersäure vermischt, in einer Quarzschale einzudampfen und nach einiger Zeit die Schwefelsäure zurückzutitrieren, wurden sehr zufriedenstellende Resultate erhalten. In vielen Fällen konnte die Schwefelsäure mit einer Genauigkeit von 0,02 ccm n 45 Natronlauge titriert werden. So vielversprechend die Ergebnisse dieser einfachen Versuche waren, als Grundlage für eine quantitative Schwefelbestimmung konnten sie nicht in Betracht gezogen werden, da sich auch hier keine Angabe machen läßt, wie lange die Säuren im Wasserbad zu belassen sind. Wählt man den Zeitpunkt zu kurz, besteht die Gefahr, daß die flüchtigen Säuren noch in geringer Menge vorhanden sind, erhitzt man zu lang, so geht bereits etwas Schwefelsäure verloren. Aus allen Versuchen, die in dieser Richtung angestellt wurden, ging eindeutig hervor, daß diese einfachste Art der Trennung auf rein physikalischem Wege für die maßanalytische Bestimmung der Schwefelsäure nicht in Betracht kommen kann.

Es wurde daher erwogen, die Schwefelsäure chemisch zu binden, um jede Gefahr eines Verlustes beim Erhitzen auszuschließen. In dieser Hinsicht haben Versuche mit Kaliumsulfat zu sehr guten Ergebnissen geführt. Wird verdünnte Schwefelsäure bei Gegenwart einer ausreichenden Menge Kaliumsulfat eingedampft, so bildet die konzentrierte Säure nach der Gleichung:

$$K_2SO_4 + H_2SO_4 = 2\,KHSO_4$$

Kaliumbisulfat, welches sehr temperaturbeständig ist, und die Schwefelsäure kann in dieser Form wieder quantitativ zurücktitriert werden. Dadurch schien die Möglichkeit gegeben, beim Eindampfen des Säuregemisches die Schwefelsäure festzuhalten.

Hier muß jedoch in Betracht gezogen werden, daß auch die anderen Säuren, z. B. Salpetersäure, mit Kaliumsulfat nach der Gleichung

$$K_2SO_4 + HNO_3 = KHSO_4 + KNO_3,$$

unter Bildung von Bisulfat und Natriumnitrat reagieren können. Es bleibt sonach die Frage übrig, ob die Bildung von Bisulfat durch die Salpetersäure möglich ist, wenn gleichzeitig Schwefelsäure vorliegt. Solange sich die Stoffe in Lösung befinden, kann dies nicht der Fall sein, da die Salpetersäure aus dem gebildeten

Nitrat durch die Schwefelsäure wieder in Freiheit gesetzt wird. Die Reaktion verläuft also, solange die flüssige Phase besteht, nur in einer Richtung. Ist jedoch Salpetersäure noch vorhanden, wenn die Schwefelsäure bereits als festes Bisulfat vorliegt, so bildet sie nach der früheren Gleichung ebenfalls Bisulfat.

Daraus ergibt sich, daß der Verlauf der Reaktion von der Menge der reagierenden Stoffe abhängig ist, was auch die Versuche bestätigten. Ist Salpetersäure und Kaliumsulfat im großen Überschuß vorhanden, so kommt es trotz der Gegenwart von Schwefelsäure zur Bildung von Bisulfat und Kaliumnitrat. Ist Kaliumsulfat in unzureichender Menge oder Schwefelsäure im Überschuß vorhanden, so wird die Salpetersäure vollkommen verdrängt und nur die Schwefelsäure als Bisulfat gebunden. Da man im konkreten Fall einer Schwefelbestimmung nicht weiß, wieviel von dem Säuregemisch vorliegt und in welchem Mengenverhältnis die Schwefelsäure zu den anderen Säuren steht, kann man auch nicht bestimmen, wieviel Kaliumsulfat der Lösung zugesetzt werden soll. Damit scheidet auch diese Methode als Grundlage für eine quantitative Schwefelbestimmung aus.

Die Abhängigkeit dieser Reaktion von den Mengenverhältnissen der Stoffe ist ursprünglich durch die Löslichkeit des Alkalisulfats bedingt. Es wurde daher versucht, an Stelle von Kaliumsulfat Bariumsulfat zur Abbindung der Schwefelsäure zu benützen. Bariumsulfat ist in konzentrierter Schwefelsäure löslich und bildet das zuerst von BERZELIUS[8]) dargestellte Bariumbisulfat $BaH_2(SO_4)_2$. Experimentell hat sich die Verwendung von Bariumsulfat als vollkommen unbrauchbar erwiesen. Aus der Literatur ist über das Bariumbisulfat wenig zu entnehmen, es scheint sich nur langsam bei niederer Temperatur zu bilden und beim Erhitzen leicht in Bariumsulfat und Schwefelsäure zu zerfallen.

Mit diesen Versuchen schien die letzte Möglichkeit erschöpft, die Frage der maßanalytischen Bestimmung des Schwefels in organischer Substanzen überhaupt zu lösen. Das einzig Positive, das aus diesen Versuchen hervorging, blieb die Verhinderung von Schwefelsäureverlusten beim Erhitzen durch Zusatz von Alkalisulfat.

Auf Grund dieses einzigen Ergebnisses wurden neuerliche Untersuchungen aufgenommen, und zwar nach folgender Überlegung:

[8]) A. *46*, 241 (1843).

Liegt ein Gemisch von Säuren, wie es bei der Verbrennung organischer Schwefelverbindungen entsteht, vor und titriert man dasselbe mit Natronlauge, so werden alle Säuren in die Natriumsalze übergeführt, gleichzeitig ist der Gesamtalkaligehalt der Lösung bekannt. Fügt man nun diesem Alkaligehalt entsprechend die äquivalente Menge Schwefelsäure zu, so werden alle flüchtigen Säuren aus ihren Salzen verdrängt unter Bildung von Natriumsulfat, nur derjenige Anteil des Salzes, welcher bereits als Natriumsulfat vorlag, bildet mit der äquivalenten Menge Schwefelsäure das Bisulfat. Titriert man nun nach dem Eindampfen der Lösung zurück, so entspricht der Verbrauch an Lauge direkt der Schwefelsäure, die ursprünglich vorhanden war.

Im Grunde genommen liegen hier die gleichen Verhältnisse vor, wie bei den früher besprochenen Versuchen mit Kaliumsulfat. Das gesamte Alkali ist in Form von Natriumsulfat vorhanden und daneben das Gemisch der Schwefelsäure mit den übrigen Säuren. In den Mengenverhältnissen der reagierenden Stoffe ist jedoch hier ein Unterschied gegenüber denen der früheren Versuche. Das Natriumsulfat steht bei dieser Versuchsanordnung immer im einfachen molekularen Mengenverhältnis zu den Säuren. Dadurch ist eine Komponente fixiert und es bleibt nur die Frage übrig, in welchem Mengenverhältnis die Schwefelsäure zu den übrigen Säuren vorliegen darf, um beim Eindampfen dieselben restlos zu verdrängen. Diese Versuche führten zu einem sehr günstigen Ergebnis. Es zeigte sich, daß unter diesen Versuchsbedingungen die flüchtigen Säuren nicht nur in äquivalenter Menge vorhanden sein können, sondern daß dieselben sogar das doppelte Äquivalent der Schwefelsäure erreichen dürfen, ohne daß es beim Eindampfen der Lösung zu einer merklichen Bildung von Bisulfat durch diese kommt. Erst wenn die flüchtigen Säuren im drei- bis vierfachen Überschuß vorhanden sind, tritt eine Erhöhung der Bisulfatbildung ein, die das analytische Ergebnis stören würde. Diese Versuche haben jedoch nur Gültigkeit, wenn es sich um Gemische von Schwefelsäure mit Salpetersäure oder Schwefelsäure mit Halogenwasserstoff handelt. Ist Schwefelsäure, Salpetersäure und Salzsäure gleichzeitig vorhanden, kommt es beim Eindampfen zu einem geringen Verlust an Schwefelsäure.

In bezug auf die Schwefelbestimmung läßt sich folgende Überlegung anstellen: Beim Verbrennen einer organischen Substanz, welche im Molekül ein Schwefelatom enthält, wird ein Molekül

Schwefelsäure gebildet, ein Stickstoff- oder Halogenatom ergibt dagegen nur eine einbasische Säure. Somit können im Molekül einer Substanz auf ein Atom Schwefel vier Atome Stickstoff oder Halogen kommen, ehe im Gemisch der Säuren die flüchtigen Säuren das doppelte Äquivalent der Schwefelsäure überschreiten. Ferner würden Substanzen, die Stickstoff und Halogen enthalten, bei der Analyse um einige Zehntelprozente zu tiefe Schwefelwerte ergeben.

In der Praxis liegen die Verhältnisse jedoch viel günstiger. Es zeigte sich, daß von der berechneten Menge der flüchtigen Säuren, die bei der Verbrennung entstehen sollten, tatsächlich nur ein Bruchteil davon titriert wurde. Mehr als ein Drittel der stickstoffhaltigen Verbrennungsgase werden im Perlenrohr nicht absorbiert und entweichen. Bei Halogen bleibt die Bildung und Aufnahme von Halogenwasserstoff im Perlenrohr oft auf einige Prozente der theoretischen Menge beschränkt. Es können sonach im Molekül einer Substanz acht Stickstoff- oder Halogenatome auf ein Schwefelatom kommen, ohne daß die Gefahr eines zu großen Überschusses von flüchtigen Säuren gegenüber Schwefelsäure besteht. Ferner müßten Substanzen, die Stickstoff und Halogen gleichzeitig enthalten, bei der Analyse gute Resultate ergeben, da die minimale Menge von Halogenwasserstoff, die im Gemisch der Säuren vorliegt, das Resultat nicht mehr beeinflussen kann. Wie die am Schlusse dieser Arbeit angegebenen Analysen zeigen, ist infolge der unvollkommenen Absorption der stickstoff- und halogenhaltigen Gase im Perlenrohr die Schwefelsäure immer im Überschuß gegenüber den flüchtigen Säuren. Bei allen Versuchen, desgleichen bei den Analysen, wurde nach Beendigung der Titration die Lösung bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Diphenylamin-Schwefelsäure auf die Anwesenheit von Nitrat geprüft. Diese Probe fiel immer negativ aus.

Die Ausführung der maßanalytischen Schwefelbestimmung gestaltet sich sonach folgendermaßen:

Die eingewogene Substanz wird im Perlenrohr verbrannt und die Verbrennungsgase über verdünntes Perhydrol aufgefangen. Nach dem Abkühlen des Rohres wird dasselbe gründlichst ausgespült und die Waschwässer in einer Quarzschale gesammelt. Das Gemisch der Säuren wird auf dem Wasserbade eingeengt, dann mit n/45-Lauge titriert. Die neutrale Lösung wird mit der dem Alkaliverbrauch äquivalenten Menge Schwefelsäure versetzt, die

Lösung dann bis zur Trockne verdampft und schließlich in einer zweiten Titration das gebildete Bisulfat bestimmt, welches der Menge der ursprünglich vorhandenen Schwefelsäure entspricht.

Ausführung der Bestimmung.

Geräte:

Das Perlenrohr: Das Perlenrohr war in seiner ursprünglichen Form mit Porzellanperlen gefüllt. Diese erwiesen sich jedoch als porös und wurden später durch Glasperlen ersetzt. Da aber Glasperlen aus minderwertigem Glas bestehen, werden jetzt nach Angabe PREGL's Verbrennungsröhren aus Supremaxglas hergestellt, welche an Stelle der Perlen eine Spirale aus Jenaer Geräteglas enthalten. Diese ist gegen Einfluß der Säuren sehr beständig und hat den Vorteil, daß beim Drehen des mit Flüssigkeit gefüllten Rohres Gasblasen sofort längs der Spirale an die Oberfläche laufen, wodurch die quantitative Ausspülung des Rohres erleichtert wird.

Quarzschale: Für die Versuche wurde eine Schale aus dünnwandigem, geblasenem Milchquarz mit einem Durchmesser von 11 cm und einer Tiefe von 5 cm verwendet. Andere Schalen sind für diese Zwecke unbrauchbar, da sie von den konzentrierten Säuren zu stark angegriffen werden.

Büretten: Zur Titration wurden die gewöhnlichen Mikrobüretten mit einem Fassungsraum von 10 ccm und einer Einteilung auf 0.05 ccm verwendet. Zum Nachfüllen bedient man sich zweckmäßig einer Pipette.

Perhydrol: Es wurde säurefreies Perhydrol der Firma Merk verwendet. Um das lästige Aufschneiden und Zuschmelzen des Paraffinverschlusses (wobei leicht kleine Paraffinteilchen in die Flüssigkeit fallen können) zu vermeiden, wurden nach dem ersten Öffnen der Flasche die beiden Kanäle mit einer heißen Stricknadel glatt gemacht und dann mit kleinen Korkstopfen (paraffingetränkt), wie sie bei der Mikromethoxylbestimmung Verwendung finden, zugestopft.

Normallösungen:

Die Titrationen wurden mit n 45-Lösungen durchgeführt, da die bei den Analysen zu titrierenden Säuremengen durchschnittlich 2 bis 7 ccm n 45-Lauge entsprechen, somit mit einem Büretten-

inhalt immer das Auslangen gefunden wird. Als Indikator wurde Methylrot verwendet.

Sehr wesentlich ist die genaueste Stellung des Faktors der Lauge. Die Lauge und die Schwefelsäure wurde nach dem PREGLschen Näherungsverfahren[4]) zunächst annähernd auf n/45 gebracht. Um nun den Faktor der Lauge genau zu bestimmen, kann man entweder auf einer Makrowaage eine Einwage reinster Soda vornehmen, diese in einem Liter Wasser auflösen und die Lösung als Urtiter für die Säure verwenden oder man macht mehrere Einwagen von Soda auf der Mikrowaage (3 bis 6 mg), titriert diese und benützt den so erhaltenen Faktor der Säure zur Stellung der Lauge. In beiden Fällen können kleine Fehler unterlaufen. Das Abwiegen einer kleinen Sodamenge auf der Makrowaage, Auflösen der Soda in 1 l Wasser und nachherige Entnahme einiger Kubikzentimeter zur Titration gibt für mikroanalytische Zwecke keine vollkommene Garantie der Genauigkeit des Titers. Die Einwagen kleiner Sodamengen auf der Mikrowaage im geschlossenen Rohr sind noch ungenauer, da hier die Wasseranziehung der Soda deutlich merkbar ist und man bei jeder Entarretierung der Waage eine andere Schwingung abliest. Außerdem hat man in beiden Fällen die zweifache Titration, erst Säure gegen Soda, dann Lauge gegen Säure.

Es wurde daher der mit Sodalösung als Urtiter ermittelte Faktor überprüft, und zwar in der Weise, daß reinstes Sulfonal, genauestens auf der Mikrowaage gewogen, im Perlenrohr verbrannt und die entstandene Schwefelsäure als Titer für die Lauge benützt wurde. Die so ermittelten Faktoren für die n/45-Lauge stimmen untereinander gut überein, zeigen dagegen doch eine kleine Abweichung gegenüber den mittels Soda erhaltenen. Bei Berechnung der Analysenresultate der Schwefelbestimmungen hat sich gezeigt, daß die mit dem korrigierten Faktor berechneten Werte den theoretischen Werten näher kommen als bei Verwendung der ursprünglichen, auf Grund der Sodatitration ermittelten Faktoren. Diese Überprüfung des Faktors ist sonach empfehlenswert.

Experimentelle Durchführung der Bestimmung.

Für die Analyse wählt man zweckmäßig eine Einwage von 4 bis 7 mg. Bei kleineren Einwagen macht sich infolge der geringen

[4]) „Das Näherungsverfahren" bei Bereitung von Normallösungen, Zeitschr. für analyt. Chem. *67* (1925).

Menge Schwefelsäure, die titriert wird, der geringste Fehler in der Ausführung der Titration sehr stark geltend. Die Apparatur zur Durchführung der Verbrennung ist dieselbe, wie sie für die Mikro-Schwefelbestimmung von PREGL beschrieben wurde.

Die nach PREGL's Vorschrift verwendete Wasserstoffsuperoxydlösung (ein Teil Perhydrol — fünf Teile Wasser) ist für bei Verbrennungen stickstoff- und halogenhaltiger Substanzen nicht ausreichend, da die stickstoff- und halogenhaltigen Verbrennungsgase ebenfalls Wasserstoffsuperoxyd verbrauchen. Man nimmt daher zweckmäßig 1 ccm Perhydrol, fügt 3 ccm Wasser zu, versetzt mit Indikator, titriert auf Gelbfärbung, saugt die neutrale Lösung mit dem Perlenrohr auf und verteilt durch Drehen des Rohres die Flüssigkeit auf die ganze Spirale; den Überschuß bläst man aus dem Rohr in das weite Reagenzglas. Man verwirft den Überschuß, ein kleiner Rest, welcher im Reagenzglas zurückbleibt, desgleichen etwas Flüssigkeit, die während der Verbrennung aus der Röhre austritt, werden zurückbehalten.

Für die Verbrennung nimmt man den Gasstrom nicht zu schnell (sechs bis sieben Blasen in zehn Sekunden), damit das gebildete Schwefeltrioxyd restlos absorbiert werden kann. Anderseits ist es bei Verbrennungen nach dem Prinzip der DENNSTEDT-Analyse vorteilhaft, wenn die Verbrennungsgase mit viel Sauerstoff gemengt, den Platinstern passieren. Aus diesem Grunde ist es wesentlich, die Verbrennung vollkommen gleichmäßig und sehr langsam durchzuführen. Die Verbrennung von 4 bis 7 mg Substanz braucht ungefähr 45 bis 60 Minuten. Ein zu starkes Erhitzen der Platinsterne durch den Langbrenner ist unzweckmäßig, da die günstigste Temperatur für die Bildung von Schwefeltrioxyd bei 400° liegt. Man hält daher das Rohr auf dunkle Rotglut. Zwischen Schiffchen und den Drahtnetzrollen über dem Langbrenner läßt man 6 cm Abstand.

Infolge des langsamen Gasstromes kann es vorkommen, daß beim Zersetzen der Substanz Verbrennungsprodukte zurücksteigen und sich in den kühlen Teil des Rohres (gegen die Mündung zu) wieder kondensieren. Ist man mit der Verbrennung fertig und mit dem beweglichen Brenner beim Langbrenner angelangt, schiebt man die Drahtnetzrolle und den beweglichen Brenner nochmals ganz zurück in die Nähe der Rohrmündung und glüht diesen Teil des Rohres in größeren Abständen noch einmal rasch durch, wobei man den Gasstrom etwas rascher nehmen kann.

Nach Beendigung der Verbrennung und Abkühlen des Rohres nimmt man das Schiffchen heraus und wägt es zurück (Aschebestimmung). Dann entfernt man die Platinkontaktsterne und Drahtnetzrollen, nimmt das Rohr samt dem darübergestülpten Reagenzglas in die linke Hand, spritzt das zur Spitze ausgezogene Ende des Verbrennungsrohres mit Wasser ab und stellt dann das Reagenzglas beiseite. Nun hält man die Spitze des Rohres in die Quarzschale (welche vorher mit Schwefelchromsäure gereinigt wurde) und spritzt durch die Mündung Wasser ein, bis unter ständigem Drehen des Rohres der mit Wasserstoffsuperoxyd benetzte Anteil vollgefüllt ist, läßt in die Quarzschale abfließen und beschleunigt diese eventuell durch Hineinblasen. Dieses Ausspülen wird im ganzen fünfmal vorgenommen; dann fügt man zu den Spülwässern das noch im Reagenzglas befindliche Perhydrol.

Die in der Quarzschale vereinigten Waschwässer werden auf das Wasserbad gestellt und bis auf ein Volumen von 10 bis 15 ccm eingeengt. Um ein Verkriechen der Flüssigkeit zu vermeiden, senkt man die Schale so tief in das Wasserbad, daß das Niveau der Flüssigkeit in der Quarzschale tiefer liegt als das Niveau der Wasserbadringe. Während des Einengens wird auch eventuell vorhandene CARO'sche Säure zu Schwefelsäure zerlegt. Man titriert die eingeengte Lösung auf Gelbfärbung, gibt die Schale wieder auf das Wasserbad, läßt einige Minuten stehen und fügt dann noch einige Tropfen Lauge zu bis zur Erreichung des kanariengelben Farbtones. Nun berechnet man die dem verbrauchten Alkali äquivalente Menge n/45-Schwefelsäure, läßt dieselbe zufließen, schwenkt dann einige Male kräftig um und stellt die Schale wieder auf das Wasserbad, um den Inhalt bis zur Trockne einzudampfen.

Ist alle Flüssigkeit verdampft und auf dem Boden der Schale das Salz sichtbar, dann läßt man noch mindestens eine halbe Stunde stehen. Zur Titration des gebildeten Bisulfats nimmt man den Salzrückstand mit Wasser auf, läßt einige Zeit am Wasserbade stehen, um die Kohlensäure zu entfernen, und titriert die heiße Lösung auf bestehenbleibende Gelbfärbung.

Aus dem Vergleich des Verbrauches an Lauge bei der Titration der Gesamtsäuren und der Titration des Bisulfats ergibt sich sofort, in welchem Verhältnis die Schwefelsäure zu den flüchtigen Säuren gestanden ist. Sollte es vorkommen, daß sich hier ein starker Überschuß der flüchtigen Säuren gegenüber der Schwefel-

säure ergibt, so müßte ein Kontrollversuch vorgenommen werden. Zu diesem Zwecke läßt man neuerlich einige Kubikzentimeter Schwefelsäure zufließen, dampft ein und titriert das Bisulfat wieder zurück. Entspricht der Verbrauch an Lauge der zugesetzten Menge Schwefelsäure, so waren keine flüchtigen Säuren mehr vorhanden. Ergibt sich dagegen eine kleine Differenz, so muß dieser Betrag von der früheren Bisulfattitration abgerechnet werden.

Fehlerquellen.

Die meisten Fehlresultate, die bei der Ausführung von Analysen beobachtet wurden, konnten auf mangelhafte Verbrennung der Substanz zurückgeführt werden. Vollkommen gleichmäßiges und langsames Verbrennen der Substanz und genaue Einhaltung der Gasgeschwindigkeit sind Grundbedingung für das Gelingen der Bestimmung.

Bei den Titrationen ist es technisch schwer möglich, die Flüssigkeit vorher in der Schale aufzukochen. Es ist daher erforderlich, dieselbe einige Zeit auf dem siedenden Wasserbade zu belassen, ehe die Titration ausgeführt wird. Zweckmäßigerweise wählt man bei allen Titrationen ein Flüssigkeitsvolumen von 10 bis 20 ccm.

Bei Verwendung von Quarzschalen ist große Vorsicht geboten. Obwohl dieselben aus geblasenem Quarz hergestellt sind und eine spiegelnde Oberfläche besitzen, scheinen sie doch an manchen Stellen etwas porös zu sein. So wurde beobachtet, daß nach der Behandlung derselben mit Schwefelchromsäure und nachträglichen gründlichen Auswaschens minimale Säurereste zurückgeblieben sind. Es ist daher erforderlich, die gereinigte Schale vor dem Gebrauch zu prüfen, in der Weise, daß man in dieselbe etwas destilliertes Wasser gibt, einige Zeit auf dem Wasserbade stehenläßt und dann etwas Indikator zufügt. Das heiße Wasser muß dann den rötlich-gelben Zwischenfarbton des neutralen Indikators aufweisen.

Analysen.

Berechnung: Gesucht Schwefel, gefunden Volumen n/45 H_2SO_4.
Faktor: 3563; log. Faktor: 55.182.

1. Thiocarbanilid $C_{13}H_{12}N_2S$.

4002 mg Subst.	Gesamtsäuren . . .	1,92 ccm	n/45-Lauge
	Bisulfat	1,55 „	„
8213 „ „	Gesamtsäuren . . .	4,15 „	„
	Bisulfat	3,28 „	„

Berechnet: 14,06% S. Gefunden: 13,60%, 14,23%.

2. Sulfoharnstoff CH_4N_2S.

3005 mg Subst.	Gesamtsäuren . . .	4,5 ccm	n/45-Lauge
	Bisulfat	3,54 „	„
3840 „ „	Gesamtsäuren . . .	6,42 „	„
	Bisulfat	4,56 „	„

Berechnet: 42,13% S. Gefunden: 41,97%, 42,32% S.

3. Cystin $C_6H_{12}O_4N_2S_2$.

6566 mg Subst.	Gesamtsäuren . . .	5,75 ccm	n/45-Lauge
	Bisulfat	4,92 „	„
5839 „ „	Gesamtsäuren . . .	5,39 „	„
	Bisulfat	4,36 „	„

Berechnet: 26,7% S. Gefunden: 26,7%, 26,6% S.

4. α-Phenyl-c-Phenyldithiobezylalduret $C_{29}H_{25}N_3S_2$.

4414 mg Subst.	Gesamtsäuren . . .	2,44 ccm	n/45-Lauge
	Bisulfat	1,66 „	„
3050 „ „	Gesamtsäuren . . .	1,70 „	„
	Bisulfat	1,16 „	„

Berechnet: 13,38% S. Gefunden: 13,40%, 13,56% S.

5. Tribromid des Trithioacetaldehydtrisulfons $C_6H_9O_6Br_3S_3$.

4888 mg Subst.	Gesamtsäuren . . .	3,80 ccm	n/45-Lauge
	Bisulfat	2,55 „	„
7804 „ „	Gesamtsäuren . . .	5,80 „	„
	Bisulfat	4,07 „	„

Berechnet: 18,75% S. Gefunden: 18,59%, 18,58% S.

Nach der vorliegenden Methodik wurden bisher nur Substanzen analysiert, welche im Molekül neben Schwefel entweder Stickstoff oder Halogen enthalten. Wie weit die Methode entspricht, wenn es sich um die Analyse von Substanzen handelt, welche neben Schwefel Stickstoff und Halogen gleichzeitig enthalten, konnte bisher nicht geprüft werden, da es nicht mehr möglich war, einige solcher Präparate in der erforderlichen Reinheit zu beschaffen. Über diese Versuche wird demnächst berichtet.

Zentrifugenröhrchen mit abnehmbarer Kappe.

Von **A. Friedrich.**

(Aus dem Institut für angewandte medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingelangt am 9. Juli 1929.)

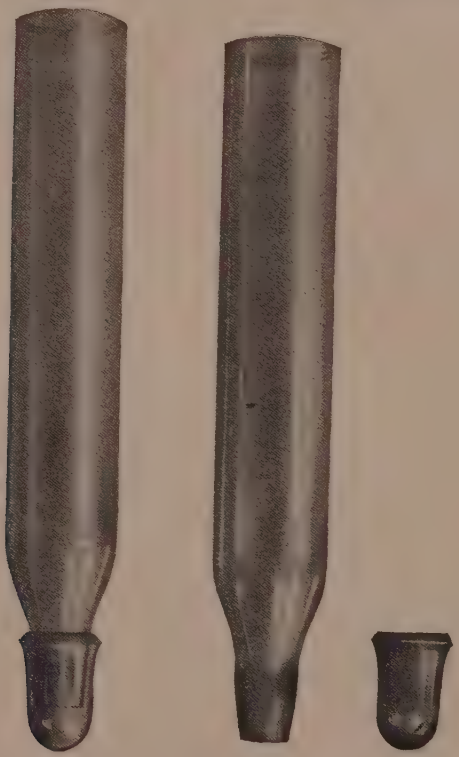
In der experimentellen Technik des mikrochemischen Arbeitens wird es vielfach vorgezogen, an Stelle der Filtration eines Niederschlages denselben zu zentrifugieren und dann die Flüssigkeit durch Dekantieren von diesem zu trennen. Der Vorteil dabei liegt nicht nur darin, einen Niederschlag oder eine Fällung rasch und ohne Verlust zu sammeln, durch die Vermeidung von Filtern bleibt die Substanz auch frei von Fasern.

Es ergeben sich bei dieser Methode jedoch auch Nachteile, und zwar dadurch, daß es oft mit Schwierigkeiten und Substanzverlusten verbunden ist, den am Boden des Zentrifugierröhrchens gesammelten Niederschlag aus demselben zu entfernen. Vor allem bei Fällung von kolloiden Stoffen weist der Bodensatz meist gallertartigen Charakter auf und klebt an den Wandungen des Gefäßes fest. Versucht man auf rein mechanischem Wege mit Hilfe eines Spatels oder einer Öse denselben herauszuholen, so ist dies auf jeden Fall mit Substanzverlusten verbunden, die relativ um so größer sind, je geringer die Menge des Niederschlages ist. Die zweite Möglichkeit, durch Ausspritzen des Röhrchens denselben herauszuschwemmen, führt zur Ansammlung größerer Flüssigkeitsmengen, was nicht erwünscht ist.

Um diese Nachteile zu umgehen, wurde versucht, Zentrifugenröhrchen in zwei Teilen herzustellen, und zwar in der Weise, daß der unterste Teil des Zentrifugenröhrchens, in welchem sich der Niederschlag sammelt, eine Art Kappe bildet, welche mit Hilfe eines Schliffes mit dem anderen Teil verbunden werden kann. Diese Anordnung ermöglicht es, nach dem Zentrifugieren und Abgießen der Lösung die Kappe abzuheben, den Niederschlag z. B. in einem Exsikkator zu trocknen und dergleichen, wobei dieses mit einem Innenschliff versehene Stück gleichzeitig als zweckmäßiges Substanzröhrchen Verwendung findet. Da die Dimensionierung dieser Kappe sehr klein ist, kann dieselbe auch auf der Mikrowaage ge-

wogen werden, wodurch sich weiters die Möglichkeit ergibt, eine quantitative Bestimmung des Niederschlages vorzunehmen.

Unter einigen Modellen solcher Zentrifugenröhrchen, welche mir die Firma Paul Haack in Wien herstellte, hat sich die aus der Zeichnung ersichtliche Form am besten bewährt. Bei Verwendung



dieses Röhrchens genügt es meistens, wenn man die Kappe fest auf das Schliffstück aufdrückt; es hält dann ausreichend fest und kann nach Beendigung des Zentrifugierens wieder abgehoben werden. Ganz einwandfrei ist das Funktionieren dieses Röhrchens jedoch nicht. Ist nämlich der Schliff sehr gut angepaßt, so bringt man nach dem Zentrifugieren die Teile oft schwer auseinander, ist er nicht gut angepaßt, so wirkt sich der Druck des Gefäßes nur an einigen Stellen des Schliffes aus und es kommt leicht zum Zerspringen der Kapsel.

Um solchen Möglichkeiten vorzubeugen, wurde später das Schliffstück mit Hilfe des in der Mikroanalyse gebräuchlichen KRÖNIG'schen Glaskittes verkittet. Dadurch kann der konische Schliff des Röhrchens unter der Einwirkung der Zentrifugalkraft nicht in den Hohlschliff der Kapsel gepreßt werden und der Druck verteilt sich gleichmäßig. Durch Eintauchen des Schliffstückes in warmes Wasser wird der Kitt zähflüssig und die Kappe läßt sich wieder abheben. Daß sich der an der Wandung zurückbleibende Kitt durch einfaches Abwischen mit einem mit Benzol getränkten Läppchen spielend entfernen läßt, ist bekannt.

Bisher haben sich nur kleine Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsraum von 10 bis 15 ccm Flüssigkeit bewährt. Bei größeren Modellen ist es technisch schwierig, das sich verjüngende Ende so herzustellen, daß dieses vollkommen zentrisch zur oberen Röhre steht. Liegt das Schliffstück etwas exzentrisch, so wird dieser Teil des Rohres ungleich beansprucht, was in der Regel die Zertrümmerung des Gefäßes zur Folge hat.

Das hier abgebildete Modell eines Zentrifugenröhrchens mit 15 ccm Fassungsraum und verkittetem Glasschliff hat sich dagegen sehr gut bewährt. Es ist klar, daß beim Zentrifugieren das Röhrchen auf einer weichen Unterlage, am besten auf einer Gummiplatte, aufliegen muß.

Über Anwendungsmöglichkeiten verschiedener qualitativer Mikromethoden für die pharmazeutische (toxikologische) Analyse.

Von **L. Fuchs** und **A. Mayrhofer.**

(Aus dem pharmakognostischen Institute der Universität in Wien.)

(Eingelangt am 24. Juni 1929.)

In wiederholten Veröffentlichungen wurde von dem einen der Verfasser obiger Arbeit[1]) auf die vielfachen Anwendungsmöglichkeiten spezieller qualitativer mikrochemischer Methoden bei der Arzneimittelprüfung hingewiesen. Dabei wurde auch die Frage, inwieweit die Identifizierung reiner chemisch-pharmazeutischer Präparate unter Anwendung der Mikrosublimation bei bestimmten Temperaturintervallen und der Bestimmung des Lichtbrechungsvermögens möglich sei, weitgehend überprüft. Die Vorteile der Möglichkeit einer Klassifizierung der ungeheuren Zahl der heute im Arzneischatze aufgenommenen derartigen Präparate auf Grund verschiedener Konstanten, besonders Schmelzpunkt, Sublimationstemperatur, Morphologie der Sublimate und Brechungsvermögen, sollten dadurch aufgezeigt werden. Allerdings ist bei der großen Fülle des zu bearbeitenden Materials noch ein weiter Weg zurückzulegen, bis an eine weitgehend lückenlose Zusammenstellung in Tabellen auf Grund obiger Kennzahlen gedacht werden kann.

Eine andere Frage, ob es mit Hilfe einzelner der vorhin aufgezählten Methoden für sich oder aber in Verbindung miteinander möglich sei, Gemische verschiedener, sonst chemisch reiner Sub-

[1]) Mayrhofer A. Über mikrochemische Arzneimittelprüfung. Pharm. Monatshefte 1922. — Schmelzpunktbestimmung, verbunden mit Mikrosublimation als Hilfsmittel zur Identifizierung organischer Arzneikörper auf mikrochemischem Wege. Pharmazeut. Presse 1922. Folge 9 und 10. — Physikalische Konstanten im Dienste der Arzneimittelprüfung mit Mikromethoden. Pharm. Monatshefte 1924. Nr. 11. — Physikalische Konstanten im Dienste der Arzneimittelprüfung mit Mikromethoden. Pharm. Monatshefte 1926. Nr. 4—7. — Wasicky R. u. Mayrhofer A. Die Anwendung mikrochemischer Methoden bei der Untersuchung der Heilmittel und Gifte. Fortschritte der Mikrochemie. Verl. Fr. Deuticke, Wien 1927. — Mayrhofer A. Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte. I. Teil. Verl. Urban und Schwarzenberg, Berlin-Wien 1928. — Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte. II. Teil. Verl. Urban und Schwarzenberg, Berlin-Wien 1928.

stanzen (z. B. Pulvergemische, die vom Arzte für bestimmte therapeutische Zwecke verordnet wurden) auf raschem Wege und mit geringem Substanzverbrauch zu identifizieren, wurde bisher nicht angeschnitten. Es ist nun der Zweck der nachfolgenden Mitteilungen, einzelne Möglichkeiten an verschiedenen Beispielen herauszugreifen und die dabei in Betracht kommenden Eventualitäten näher zu beleuchten.

Die in dieser Richtung durchgeführten Versuche erstreckten sich auf Untersuchungen über die Anwendbarkeit der Bestimmung der Brechungsindices in Substanzen für sich, in Gemischen in Form von Tabletten oder lege artis nach der Rezeptformel des Arztes hergestellten Pulvergemischen; Anwendbarkeit der Bestimmung der Brechungsindices in Sublimaten nach vorher durchgeführter Mikrosublimation bei bestimmten Temperaturintervallen; Anwendungsmöglichkeiten dieser und anderer spezieller qualitativer Mikromethoden bei toxikologischen Untersuchungen.

Um Mißverständnissen von vornherein aus dem Wege zu gehen, seien die rein praktischen Momente hervorgehoben, die die Bestimmungen nicht als streng wissenschaftlich präzise Feststellungen bestimmter Kennzahlen, sondern als Durchschnittszahlen, die als Mittel zum Zweck dienen sollen, erscheinen lassen. Dies gilt in besonderem Maße für die Bestimmung der Brechungsindices kristallisierter Substanzen. Vom wissenschaftlichen Standpunkte des Mineralogen wären ja für die Angabe der Brechungsindices bei optisch anisotropen, besonders optisch zweiachsigen Kristallen (bekanntlich besitzen optisch isotrope Kristalle einen Brechungsindex, anisotrope Kristalle zwei Indices, wenn sie optisch einachsig, drei Indices, wenn sie optisch zweiachsig sind) eine genaue mineralogische Orientierung notwendig. Nachdem derartige Präzisionsbestimmungen aber nicht in der Natur der Sache und dem damit verfolgtem Zwecke begründet sind, wurde für diese Arbeitsrichtung die bereits von verschiedenen Forschern, wie Schroeder van der Kolk, P. Kley, A. Bolland und anderen[2]), verwendete Methode der Bestimmung des höchsten und des niedrigsten Brechungsindex an einer größeren Anzahl von Kriställchen, bezw. deren Fragmenten im polarisierten Lichte unter Heranziehung der Becke'schen Linie zur Erkennung des stärkeren oder schwächeren Brechungsvermögens gegenüber bestimmten Ein-

[2]) Siehe darüber: Mayrhofer A. Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte. II. Teil. 1928. Seite 33 u. f.

bettungsflüssigkeiten (in den meisten unserer Fälle Mischungen von reinstem Paraffinöl mit α-Monobromnaphthalin) benützt. Es würde zu weit führen, auf Einzelheiten der Bestimmungsmethode näher einzugehen und sei diesbezüglich auf die unten zitierten Angaben verwiesen. Es sei hier lediglich auf die Schwierigkeiten, die sich bei der Bestimmung häufig ergeben können, aufmerksam gemacht. Außer der entsprechenden mineralogischen Orientierung können diese noch durch andere Umstände, wie z. B. teilweise Verwitterung, Übereinanderlagerung von Kristallschollen sowie durch die Kleinheit der Kristalle, bezw. Kristallfragmente, bedingt sein. Es ergeben sich durch diese Umstände, speziell durch die hin und wieder eintretende Ausbildung der Kristalle, bei der Sublimation nach einer bestimmten Richtung Unregelmäßigkeiten und Schwankungen in der Höhe der Brechungsindices. Auf diese Tatsache wurde bereits in einer früheren Veröffentlichung[3]) bei den Sublimaten von Veronal, Cantharidin und anderen hingewiesen; als ein Fall der vorliegenden Abhandlung sei Vanillin herausgegriffen. Bei Übereinanderlagerungen von Kristallen, besonders Kristallnadeln, Kristallschollen und starken Kristallklumpen, komplizieren sich ebenfalls die Verhältnisse. Bei derartigen Bestimmungen müssen sich die Beobachtungen auf die Feststellung der Häufigkeit des höchsten und niedersten Index beschränken; manche Kristalle lassen aber den niedersten oder höchsten Index nicht erkennen, sind in beiden Richtungen des polarisierten Lichtes stärker, beziehungsweise schwächer brechend, scheiden daher mehr oder weniger als Beobachtungsobjekte für die Untersuchung aus. Selbstverständlich wird dann eine derartige Bestimmung, besonders wenn es sich um Beobachtungen in Gemischen handelt, bezüglich ihrer Wertung ziemlich unsicher. Bezüglich der Sublimation bei bestimmten Temperaturen muß auf die angeführten Veröffentlichungen verwiesen werden. Bemerkt sei nur, daß für die nachfolgenden beschriebenen Untersuchungen speziell die Mikrosublimation nach Kempf[4]) verwendet wurde. Sind nun die Kristalle in den Beschlägen gut ausgebildet, so genügen ganz geringe Mengen der Substanz, um mit Hilfe der Sublimation auch in den Sublimaten die Höhe des Brechungsvermögens kontrollieren zu können. Die

[3]) Mayrhofer A. Physikalische Konstanten im Dienste der Arzneimittelprüfung mit Mikromethoden. Pharm. Monatshefte 1926. Nr. 4—7.

[4]) Kempf R. Über ein neues Verfahren der Mikrosublimation. Zeitschr. f. analyt. Chemie. 62. 284.

notwendigen geringen Substanzmengen lassen sich annähernd aus folgenden Überlegungen errechnen. Angenommen, für die Bestimmung des Indices würden vier Sublimate mit je zehn Kristallen zur Bestimmung vollkommen genügen. Bei Santonin z. B. erhalten wir zum großen Teil rechteckige prismatische Kristalle mit einer Kantenlänge von 200 bis 500 μ und einer Breite von 60 bis 90 μ. Werden bei der Berechnung des Rauminhaltes Durchschnittswerte von 300 und 70 μ in Rechnung gestellt, so würde sich als Rauminhalt für ein Prisma von diesen Dimensionen ein annähernder Wert von 150.000 μ^3 ergeben. Das spezifische Gewicht als 1 angenommen, ergäbe dafür ein Gewicht von 15 γ. Das spezifische Gewicht des Santonins beträgt nach SCHMIDT (Pharmazeut. Chemie. 5. Aufl.) 1,247, dadurch erhöht sich das Gewicht des einzelnen Kristalls auf 18,8 γ. Aufgerundet auf 20 γ würden für die 40 Kristalle in den vier Sublimaten 800 γ oder 0,8 mg Substanz notwendig sein, eine Zahl, die bereits als Höchstzahl zu werten ist, da ja bedeutend kleiner dimensionierte Kristalle und diese wieder in geringerer Zahl für die Bestimmungen genügen werden. Voraussetzung bei diesen Überlegungen ist allerdings, daß es bei den Versuchen gelingt, einwandfreie, gut ausgebildete, kristallinische Sublimate zu erhalten.

In dem nun folgenden experimentellen Teil erscheinen die praktischen Erfahrungen mit den einzelnen Methoden, Sublimation, Kristallisation usw., in Verbindung mit der Bestimmung des Brechungsvermögens an verschiedenen Präparaten zusammengestellt und einer vergleichenden Kritik unterzogen.

Experimenteller Teil.

Vanillin und Bourbonal.

In der Literatur finden sich nur spärliche und zum Teil widersprechende Angaben über Reaktionen und Konstanten, die eine Unterscheidung der chemisch nahe verwandten Substanzen Vanillin und Bourbonal ermöglichen sollen.

So gibt z. B. L. ROSENTHALER[5]) an, ein von ihm untersuchtes, dem Handel entnommenes Bourbonal hatte einen Schmelzpunkt von 79° und gab mit Eisenchlorid, Orzin-, Phlorogluzin- und

[5]) ROSENTHALER L. Der Nachweis organischer Verbindungen. 11. Aufl. Verlag von Ferd. Enke in Stuttgart. Seite 156.

Resorzin-Salzsäure, mit Nitromethan und Ammoniak wie auch mikrochemisch mit weingeistiger Kali- und Natronlauge die gleichen Reaktionen wie Vanillin, eine Unterscheidung auf diesem Wege sei daher nicht möglich. In Übereinstimmung mit H. Schellbach und Fr. Bodinus[6]) fanden J. Pritzker und R. Jungkunz[7]) den Schmelzpunkt des Bourbonals bei 77°, bezw. nach dem Umkristallisieren aus Wasser bei 77,5°. Letztere Autoren geben außerdem noch einige Konstanten und Reaktionen an, die für eine Unterscheidung von Vanillin und Bourbonal geeignet erscheinen, wenn diese in reiner Form vorliegen, und zwar für Bourbonal: Schmelzpunkt des m-Nitrobenzhydrazids 188 bis 189°, Reaktion nach Nickel negativ, mit alkoholischer Kalilauge Gelbfärbung; für Vanillin: Schmelzpunkt 80 bis 82,8°, Schmelzpunkt des m-Nitrobenzhydrazids 213° (nach Rosenthaler 152°)[8]), mit dem Nickel'schen Reagens weinrote Färbung, mit alkoholischer Kalilauge fast farblos.

Es ist klar, daß bei Gemengen von Vanillin und Bourbonal die angeführten Reaktionen ein falsches Bild der wahren Sachlage geben werden, doch schon bei reinen oder nahezu reinen Substanzen sind die erwähnten Farbreaktionen nicht verläßlich. Rosenthaler dürfte überhaupt kein reines Bourbonal in Händen gehabt haben.

Als Untersuchungsmaterial standen uns außer reinstem Vanillin (Schmelzpunkt 82°) ein Bourbonal der Firma Haarmann & Reimer und ein Bourbonal unbekannter Herkunft, das uns als angebliches Vanillin zur Untersuchung übergeben worden war, zur Verfügung. Daß die letztgenannte Substanz nahezu reines Bourbonal war, wurde auch durch die Elementaranalyse bestätigt.

Das Bourbonal der Firma Haarmann & Reimer hatte einen Schmelzpunkt von 77° (nach Umkristallisieren aus Wasser 77,5°), das Bourbonal unbekannter Herkunft von 77,5°. Mit dem von H. Kreis und J. Studinger[9]) modifizierten Nickel'schen Reagens gaben beide Bourbonalproben Färbungen, die den durch reines Vanillin bedingten Farbtönen sehr ähnlich waren, wenn auch die Farbtiefe bei Verwendung gleicher Substanzmengen, z. B. von je

[6]) Ztschr. f. Unters. d. Nahrgs.- u. Genußmittel 1920, *40*, 34—37.

[7]) Ztschr. f. Unters. d. Lebensm. 1928, *55*, 424—6, und Pharmaceutica Acta Helvetiae, *4*, 15—21.

[8]) l. c.

[9]) Mitt. Lebensmittelunters. u. Hyg. d. Schweiz. Gesundheitsamtes 1927, *18*, 333—34.

0,02 mg pro 1 ccm wässeriger Lösung, etwas geringer war als bei der analogen Vanillinprobe. Mit alkoholischer Kalilauge trat zwar bei dem Bourbonal der Firma Haarmann & Reimer deutliche Gelbfärbung ein, hingegen löste sich das Bourbonal unbekannter Herkunft fast farblos, verhielt sich also wie Vanillin.

Um nun Vanillin auch in sehr kleinen Mengen von Bourbonal unterscheiden zu können, wurde zur Charakteristik dieser Substanzen die bereits in vielen Fällen bewährte Methode der Bestimmung der Brechungsindices nach dem Einbettungsverfahren herangezogen. Die Brechungsindices von Vanillin wurden von A. Mayrhofer[10]) mit 1,55 und größer als Jodmethylen angegeben. Für Bourbonal sind in der Literatur keine entsprechenden Angaben vorhanden. Bei den seinerzeit durchgeführten Untersuchungen dienten als Einbettungsflüssigkeiten Gemische von ätherischen Ölen, während wir jetzt die besser geeigneten Mischungen von reinstem Paraffinöl mit α-Monobromnaphthalin verwendeten. Dadurch kann der niederste Brechungsindex des Vanillins genauer mit 1,555 angegeben werden.

Die Kriställchen von Bourbonal erwiesen sich unter dem Polarisationsmikroskop wie Vanillin optisch anisotrop. Bei Verwendung einer Einbettungsflüssigkeit mit dem Brechungsindex 1,555 (niederster Index von Vanillin) waren alle Bourbonalkristalle in einer Richtung deutlich stärker brechend, in der anderen Auslöschungsrichtung zum Unterschied von Vanillin deutlich schwächer brechend wie die Einbettungsflüssigkeit. In dieser Mischung von Paraffinöl und α-Monobromnaphthalin scheint allerdings das Bourbonal etwas löslich zu sein, speziell die feinsten Kriställchen werden zuerst angegriffen. Mit Jodmethylen ergab sich das gleiche Bild; in einer Richtung waren die Kriställchen stärker brechend (analog Vanillin), in der anderen Richtung schwächer brechend. Der höchste Brechungsindex ist also sowohl bei Vanillin wie bei Bourbonal größer als der von Jodmethylen, während der niederste Index des Bourbonals unter dem von Vanillin (1,555) liegt. Da das Bourbonal auch noch schwächer brechend war wie reines Paraffinöl (1,482) und reines Glyzerin (1,465), wurden Mischungen von Glyzerin und Wasser (1,333) hergestellt, die eine genaue Bestimmung des niedersten Brechungsindex von Bourbonal ermöglichten. Derselbe wurde mit 1,434 gefunden. Fast alle Kristalle verlöschen in

[10]) Pharmazeut. Monatshefte 1926. Nr. 4—7.

dieser Einbettungsflüssigkeit in einer Richtung nahezu vollständig. Nur vereinzelt waren Kriställchen zu finden, die in beiden Richtungen stärker brechend waren. (Auf diese Umstände wurde bereits früher allgemein aufmerksam gemacht.) Auch das Bourbonal unbekannter Herkunft zeigte die gleichen Brechungsindices (1,434 und größer als Jodmethylen).

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Bourbonal der Sublimation im KEMPF'schen Apparat bei einer Sublimationshöhe von rund 0,5 mm unterworfen. Nach zwei Stunden konnte bei einer Temperatur von 42 bis 44° ein feiner Beschlag festgestellt werden, nach 24 Stunden war ein kräftiges Sublimat entstanden, das hauptsächlich aus mehr oder weniger regelmäßig ausgebildeten länglichen, sechseckigen Blättchen und Stäbchen bestand, daneben fanden sich auch noch fünfeckige Blättchen und Nadeln. (Fig. 1.)

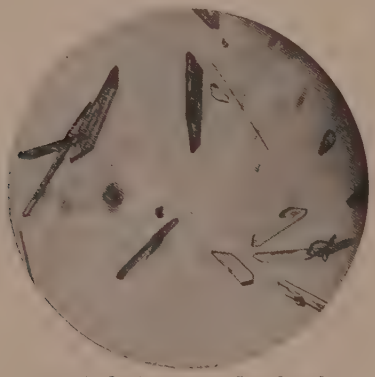


Fig. 1. Sublimat von Bourbonal.

Rascher erhält man brauchbare Sublimate, wenn man bei Temperaturen zwischen 45 und 50° arbeitet. Meist entstehen zuerst tröpfchenförmige Sublimate, doch bilden sich beim weiteren Sublimieren von selbst Kristalle aus. Beschleunigen läßt sich die Kristallbildung durch kurze Unterbrechung der Sublimation nach Auftreten des tröpfchenförmigen Beschlages und Reiben des Sublimates mit einer Nadel. Im Apparat von A. MAYRHOFER wurden auf diese Weise zwischen 45 und 50° ebenfalls schön ausgebildete Sublimate erhalten.

Die Bestimmung der Brechungsindices der durch Sublimation erhaltenen Kristalle ergab die gleichen Werte wie die direkt beim

Bourbonal erhaltenen (1,434 und größer als Jodmethylen), doch wurden hier etwas häufiger Kristalle gefunden (meist dickere, stäbchenförmige), die in beiden Richtungen stärker brechend waren als die Einbettungsflüssigkeit mit dem Index 1,434. Bei der Bestimmung des höchsten Brechungsindex mit Jodmethylen machte sich speziell bei Sublimaten mit sehr dünnen Kristallen die Löslichkeit des Bourbonals in dieser Flüssigkeit unangenehm bemerkbar; bei kräftigeren Sublimaten ließ sich jedoch einwandfrei feststellen, daß die Kristalle in einer Richtung stärker brechend waren als Jodmethylen.

Vanillin, das unter den gleichen Bedingungen wie das Bourbonal im KEMPF'schen Apparat der Sublimation unterworfen wurde, gab erst bei 59° einen tröpfchenförmigen Beschlag, aus dem sich nach Reiben mit einer Nadel und Fortsetzung der Sublimation bei 59 bis 62° schöne sechseckige Kristalle bildeten. (Fig. 2.)

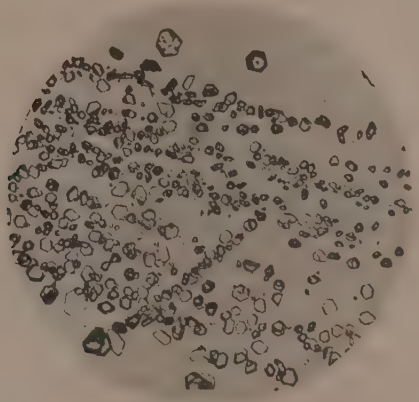


Fig. 2. Sublimat von Vanillin.

Vereinzelt wurden bei der Sublimation von Vanillin auch langgestreckte rechteckige Blättchen erhalten. Die Brechungsindices der sechseckigen Blättchen entsprachen den beim Vanillin direkt gefundenen Werten (1,555 und größer als Jodmethylen), während der niederste Index der rechteckigen Blättchen unter 1,555 lag. Es war uns vorläufig nicht möglich, die Bedingungen festzustellen, unter denen die Bildung der rechteckigen Blättchen eintritt. Wir erhielten bei allen weiteren Sublimationsversuchen nur immer die der Fig. 2 entsprechenden Formen.

Dieses seltene Auftreten einer von der Norm abweichenden Kristallform, die sich auch durch den Brechungsindex von den gewöhnlich entstehenden Kristallen unterscheidet, könnte leicht zu einem Irrtum führen, weshalb hier auf diese Möglichkeit bei Untersuchung nur eines einzigen Sublimates hingewiesen sei.

Im allgemeinen gelingt es leicht, durch Bestimmung der Brechungsindices Bourbonal und Vanillin wie auch deren Sublimate voneinander zu unterscheiden. Handelt es sich um eine Mischung dieser beiden Substanzen, so verlöschen bei Anwendung der Einbettungsflüssigkeit mit dem Brechungsindex 1,555 die Vanillinkristalle in einer Richtung fast vollständig, während die Bourbonalkristalle nicht verlöschen und in einer Auslöschungsrichtung schwächer brechend sind. In einem Glyzerin-Wasser-Gemisch mit dem Index 1,434 hingegen verlöschen die Bourbonalkristalle in einer Richtung vollständig und die Vanillinkristalle sind in beiden Auslöschungsrichtungen stärker brechend. Der höchste Brechungsindex liegt bei allen Kristallen der Mischung über dem von Jodmethylen.

Kurz seien hier noch zwei mikrochemische Reaktionen angeführt, mit deren Hilfe es ebenfalls gelingt, Vanillin von Bourbonal zu unterscheiden.

Durch Erwärmen einer kleinen Menge von Vanillin mit Wasser, das etwas Eisenchlorid enthält, entstehen bekanntlich feine Nadeln von Dehydrovanillin. Mit Bourbonal entstehen unter den gleichen Bedingungen keine Nadeln, sondern meist nur Tröpfchen, doch können auch, je nach der verwendeten Eisenchloridmenge, vereinzelte farnförmige kristallinische Gebilde auftreten, die aber keineswegs mit den feinen Nadeln von Dehydrovanillin zu verwechseln sind.

Löst man ein Kriställchen Vanillin in einem Tropfen alkoholischer Kalilauge (zirka n/4—n/2), so entstehen beim Verdunsten des Alkohols durchweg Büscheln aus langen Nadeln. Bourbonal zeigt auch hier ein anderes Verhalten. Beim freiwilligen Verdunsten der Lösung sieht der Rückstand, wenn die Lauge im Überschuß vorhanden war, nach kurzer Zeit unter dem Mikroskop wie ein Gewirre sich verzweigender, verschlungener Fäden aus, die aus lauter nadelförmigen Kristallen bestehen, was besonders nach dem vollständigen Verdunsten des Lösungsmittels (dies dauert allerdings längere Zeit) deutlicher hervortritt. Nimmt man jedoch im Vergleich zum verwendeten Bourbonal nur wenig Lauge, so ent-

stehen schön ausgebildete viereckige, schiefwinkelige Kristalle (manchmal auch von der Gestalt der rhombischen Doppelpyramide), die aber nicht charakteristisch sind, da unter den gleichen Bedingungen beim Vanillin ähnliche Kristallformen entstehen, wenn sich auch hier häufiger sechseckige Kristalle ausbilden.

Vanillin- und Bourbonalsublimate geben beide Reaktionen in analoger Weise.

Nachstehend eine Zusammenstellung der Eigenschaften von Vanillin und Bourbonal, die zur Unterscheidung der beiden Substanzen auch in sehr kleinen Mengen dienen können:

		Vanillin	Bourbonal
Schmelzpunkt		80° — 82°	77,5°
Sublimationstemperatur		59° — 62°	45° — 50°
Brechungsindices		1·555 — > Jodmethylen	1·434 — > Jodmethylen
Mikrochemische Reaktion:	mit sehr verd. Eisenchlorid	feine Nadeln von Dehydrovanillin	keine Nadeln (meist nur Tröpfchen)
	mit alkoholischer Kalilauge (Überschuß)	Büscheln von langen Nadeln	verschlungene, sich verzweigende Fäden

Bei den zur Untersuchung herangezogenen einfachen Tabletten interessierte in erster Linie die Frage, ob der wirksame Bestandteil in einer Zerkleinerungsform vorliegt, die eine Untersuchung im Polarisationsmikroskop ermöglicht. Die geringen, für die Herstellung der Tabletten beim Komprimieren notwendigen Zusätze wurden bei der direkten Bestimmung nicht berücksichtigt, sondern nur die charakteristischen Indices der Substanz aufzufinden versucht. Zu diesem Zwecke wurde die Tablette zerdrückt und ein kleiner Teil auf einem Objektträger mit einem Tropfen der Einbettungsflüssigkeit vom charakteristischen Brechungsindex verrieben, mit dem Deckglase bedeckt und unter dem Polarisationsmikroskop in der üblichen Weise untersucht. Zur Isolierung einzelner Bestandteile wurde die Sublimation oder

auch das Verfahren des Umkristallisierens verwendet. Die Untersuchung des Sublimats auf dem Objektträger wurde direkt mit dem Beschlage der umkristallisierten Substanz nach durchgeführter Trocknung in gleicher Art wie bei der direkten Bestimmung auf dem Objektträger durchgeführt.

Hexamethylentetramin-Tabletten, Marke „Österreichische Heilmittelstelle", à 0,5 g.

Nach dem Zerkleinern der Tablette wurden unter dem Polarisationsmikroskop unregelmäßige Schollen beobachtet, die bei gekreuzten Nikols in keiner Richtung zum Aufleuchten zu bringen waren (isotrope Kristalle mit einem Brechungsindex).

Der in der Literatur (Mayrhofer: Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte II) angegebene Brechungsindex von der Höhe 1,59 konnte bei den verschiedenen nicht aufleuchtenden Kristallschollen durchweg beobachtet werden. Einbettungsflüssigkeit: Gemisch von reinstem Paraffinöl und α-Monobromnaphthalin. Bei der Sublimation im Kempf'schen Apparat konnten bei einer Temperatur von 70° bereits nach zwei Stunden kristallinische Beschläge in Form von Einzelkristallen des tesseralen Systems (Oktaeder und Kombinationen mit einer durchschnittlichen Kantenlänge von 60 bis 100 μ) erhalten werden. Brechungsindex ebenfalls 1,59.

Für die rasche Bestimmung genügt die direkte Beobachtung des Brechungsindex in der zerdrückten Tablette.

Urotropin-Tabletten, Marke „Schering", à 0,5 g.

Es wurden die gleichen Eigenschaften in bezug auf Aussehen, Brechungsvermögen und Sublimation beobachtet.

40%ige sterile Urotropin-Lösung, Marke „Schering", in Ampullen à 5 ccm.

Durch Eindampfen eines Tröpfchens der Lösung auf einem Objektträger konnten Einzelkristalle neben Kristallschollen erhalten werden. Bei den Einzelkristallen war der Brechungsindex einwandfrei festzustellen. Unsicher wurde die Bestimmung bei den vorhandenen Kristallschollen. Wurde der Rückstand der Mikrosublimation unterworfen, so entstanden als Beschläge schöne Einzelkristalle mit dem bereits früher beschriebenen Aussehen und Brechungsvermögen.

Aspirin und Acidum acetylo salicylicum.

Die verschiedenen Konstanten der beiden Präparate für sich wurden bereits früher festgestellt (siehe A. Mayrhofer: Phar-

mazeutische Monatshefte 1926, Nr. 4 bis 7). Auf Grund des häufigen Schwankens der niedrigeren Indices (1,551 bis 1,573) wurde das Hauptgewicht auf die Beobachtung des höheren Brechungsindex 1,652 in den Tabletten gelegt. Sowohl in den Aspirin-Tabletten (Marke „Bayer") à 0,5 g als auch in den Tabletten mit Acidum acetylo salicylicum à 0,5 g (Marke „Österreichische Heilmittelstelle") wurde der höhere Index direkt in der zerkleinerten Tablette beobachtet. In der anderen Auslöschungsrichtung waren die Kristalle durchweg schwächer brechend und wurde der niederste Brechungsindex ebenfalls häufig gefunden. Zu den gleichen Ergebnissen führte auch Lösen und Umkristallisieren der Substanz aus Alkohol. Da die Sublimation bereits bei der reinen Substanz keine zur Bestimmung des Brechungsvermögens günstigen Kristallbeschläge ergab, wurde von der Sublimation des Aspirins, bezw. Acidum acetylo salicylicum aus den Tabletten abgesehen.

Die Aspirin-Tabletten „Bayer" bestanden aus bedeutend kleineren Kristallfragmenten als die Tabletten mit Acidum acetylo salicylicum, Marke „Österreichische Heilmittelstelle", besonders in letzteren ist der höhere Index sehr leicht zu beobachten. Stärke wurde in beiden Fällen beobachtet.

Umkristallisieren aus Wasser durch vorsichtiges Erhitzen unter Vermeidung von Kochen ergab Nadeln und Blättchen, bei denen die Beobachtung des höchsten Index 1,652 einwandfrei durchgeführt werden konnte.

Phenolphthalein-Tabletten, Marke „Österreichische Heilmittelstelle, à 0,2 g.

Die zerkleinerte Tablette bestand, unter dem Mikroskop betrachtet, aus scheinbar amorpher Substanz, die zur Bestimmung des Brechungsvermögens ungeeignet war. Daneben fand sich auch etwas Stärke. Versuche durch Umkristallisieren aus Alkohol, Lösen in Alkohol unter darauffolgendem Zufügen von Wasser bis zur Trübung und abermaliges Erwärmen ergaben ebenfalls keine einwandfreien Resultate. Durch die Methode der Mikrosublimation nach Kempf konnten unter nachstehenden Versuchsbedingungen schöne, kristallinische Beschläge erhalten werden.

Sublimation bei 190 bis 200° ergab nach $1^1/_2$ Stunden schwache Beschläge;

Sublimation bei 200 bis 210° ergab nach 12 Stunden starke Beschläge, dabei trat jedoch rötlichbraune Färbung des Pulvers ein;

Sublimation bei 220° ergab bereits nach $^1/_2$ Stunde schwache Beschläge;

Sublimation bei 220° ergab nach 6 Stunden starke Beschläge.

Die Beschläge waren tröpfchenförmig. Durch Reiben der schwachen Beschläge mit der Nadel und nachfolgendes Weitersublimieren konnten Nadeln und Blättchen (siehe A. Mayrhoefr, Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte II) erhalten werden. Die durch langandauernde Sublimation gewonnenen Beschläge bestanden aus langen, verfilzten Nadeln.

Bei der geringen Steighöhe des Kempf'schen Apparates wuchsen die Nadeln bei langandauernder Sublimation zu solcher Größe an, daß sie das zur Sublimation verwendete Pulver erreichten, so daß beim Abheben des als Rezipient dienenden Objektträgers die Sublimate mit geringen Mengen des Pulvers verunreinigt waren. Die in der Literatur bereits veröffentlichten Brechungsindices 1,648, 1,663 konnten auch in diesem Falle wiedergefunden werden. Einbettungsflüssigkeit: Gemisch von Paraffinöl mit α-Monobromnaphthalin.

Saccharin-Tabletten, Marke „Essef".

Nachdem die als Saccharin bezeichnete Substanz in Form von Saccharinum solubile, also als α-Benzoesäuresulfinidnatrium, in den Tabletten vorhanden ist, wurden zwecks Zersetzung des Natriumsalzes die Tabletten in Wasser gelöst, hierauf mit Salzsäure im Überschuß versetzt. Nach geringer Kohlensäureentwicklung trat zuerst Trübung, dann Abscheidung kleiner Kriställchen in Form von schiefwinkeligen, viereckigen und deltoidartigen Blättchen mit starker Doppelbrechung und symmetrischer Auslöschung ein.

Von den in der Literatur angegebenen Indices 1,615, 1,689 wurde der niedrige Index seltener, der höhere dagegen regelmäßig beobachtet. Der Niederschlag wurde nach dem Trocknen auch der Sublimation unterworfen. Im Kempf'schen Apparat wurden bei 100 bis 104° nach 4 Stunden ganz schwache Beschläge, bei 120 bis 125° nach 17 Stunden starke Beschläge in Form schöner, langer prismatischer Kristalle mit schiefen Endflächen (Länge bis 1,5 mm, Breite 100 μ) gefunden. Die Feststellung der Indices deckt sich mit den vorhergehenden Beobachtungen.

Als Einbettungsflüssigkeit wurden in der üblichen Weise bei niedrigeren Mischungen von Paraffinöl-α-Monobromnaphthalin, bei der Feststellung des höheren Brechungsindex Gemische von Jodmethylen und α-Monobromnaphthalin verwendet. Auch von diesen Gemischen waren Standardlösungen in verschiedenen Verdünnungen in analoger Weise wie Paraffinöl-α-Monobromnaphthalin sowie Glyzerin und Wasser hergestellt worden. Über die dabei gemachten Beobachtungen in bezug auf Haltbarkeit der Gemische, das Brechungsvermögen von vollkommen reinem, frisch destilliertem, farblosem und älterem, durch Jodausscheidung bereits rötlich gefärbtem Jodmethylen usw. wird in einer späteren Veröffentlichung berichtet werden.

Acetphenetidin-Tabletten, Marke „Österreichische Heilmittelstelle, à 0,5 g.

Die zu Pulver zerkleinerten Tabletten ließen unter dem Mikroskop nur Kristallbrocken, meist inkrustiert mit kleinpulveriger Substanz, und zu Klumpen zusammengebackenes Pulver neben Stärke erkennen. Zur Bestimmung des Brechungsvermögens war daher dieses Material wenig geeignet. Die großen Löslichkeitsunterschiede des Acetphenetidins in kaltem (1 : 1400) und heißem Wasser (1 : 80) waren hier für das Umkristallisieren besonders

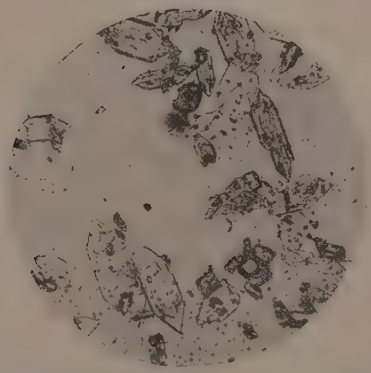


Fig. 3. Kristalle von Acetphenetidin aus Wasser umkristallisiert.

günstig. Es konnten auf diese Art die typischen sechseckigen Kristallblättchen, die häufig mit den spitzen Enden zu Zwillingen verwachsen sind, neben langgestreckten, rechteckigen Blättchen erhalten werden. (Fig. 3.) Größe 400×100 μ. Bereits in der

Literatur wird auf ein Schwanken der Indices innerhalb bestimmter Intervalle aufmerksam gemacht. Bei den in der geschilderten Weise erhaltenen Kristallen und Kristallfragmenten wurden am häufigsten die Indices 1,532 und 1,57, seltener der niedrigste und höchste Index 1,523 und 1,587 beobachtet. Diesem Übelstande, daß gerade der niedrigste und höchste Index am wenigsten zu beobachten sind, ist infolge der Unmöglichkeit der genauen Orientierung der Kristalle nicht beizukommen. Die Angabe der häufig auftretenden Indices kann daher nur als Erfahrungstatsache von rein praktischem Werte betrachtet werden, die eventuell durch die in diesen Fällen auftretende Lagerung und Entwicklung der Kristalle in bestimmten Richtungen begründet ist.

Im KEMPF'schen Apparat der Mikrosublimation unterworfen, wurden aus den Tabletten bei 70 bis 80° nach 10 Stunden Beschläge aus rechteckigen und quadratischen Platten neben langen und gedrungenen Nadeln erhalten. Die vorher angegebenen Indices konnten nur bei den Platten deutlich beobachtet werden.

Als Tabletten, bestehend aus Gemischen von Phenacetin mit einer anderen Substanz, wurden Tabletten der Firma Bayer aus Phenacetin und Veronal je 0,25 g untersucht.

Die Gegenüberstellung der diesen beiden Substanzen eigentümlichen Konstanten ließ die Schwierigkeiten einer raschen und einwandfreien direkten Beobachtung von vornherein mutmaßen. Die in der Literatur angegebenen Zahlen sind für die fraglichen chemischen Individuen folgende:

Kennzahlen		Phenacetin	Veronal
Sublimationstemperatur (Methode MAYRHOFER)		115 — 120°	105 — 130°
Brechungsindices		1,523, 1,532, (1,57 bis 1,587)	1,463, 1,552, 1,577
Löslichkeit in Wasser:	kalt (15°)	1:1400	1:170
	heiß (100°)	1:70	1:17

Wie aus der vorstehenden Tabelle ersichtlich ist, greifen die Intervalle der Sublimationstemperaturen ineinander über. Dadurch werden bei der Mikrosublimation immer die beiden Substanzen nebeneinander erhalten werden. Bei beiden Substanzen ist in der Höhe der vorkommenden Brechungsindices ein gewisses Schwanken zu beobachten. Eine weitere Erschwerung der Bestimmung liegt darin, daß die Indices fast innerhalb derselben Grenzen liegen, so daß infolge der Schwankungen nur bei den niedersten Indices von einer sicheren Möglichkeit in der Idenditätsfeststellung gesprochen werden kann, besonders da der niederste Index von Veronal aus der Reihe herausfällt. In der pulverisierten Tablette konnten an den verschiedenen Kristallfragmenten unter dem Polarisationsmikroskop am häufigsten die Indices 1,532 und 1,552, sowie auch die höheren 1,57 bis 1,587 gefunden werden, die niedrigsten, 1,523, bezw. 1,463, waren leider nur selten zu beobachten.

Dieselben Ergebnisse waren bei der Mikrosublimation zu erwarten, da bereits in früheren Arbeiten das seltene Auftreten des niedrigsten Index in Veronalsublimaten beobachtet worden war. Diese Vermutung konnte auch hier durch den Versuch bestätigt werden. Wie aus der Tabelle ersichtlich, zeigen die Löslichkeitsverhältnisse der beiden Substanzen in kaltem und heißem Wasser größere Unterschiede, so daß eine günstige, weitgehende Trennungsmöglichkeit in der fraktionierten Kristallisation aus Wasser gegeben war. Tatsächlich gelang es auch auf diesem Wege durch Erhitzen mit Wasser und rasches Abkühlen das in kaltem Wasser sehr schwer lösliche Phenacetin, aus der Mutterlauge das leichter lösliche Veronal in kristallisiertem Zustande zu erhalten. An den getrockneten Kriställchen konnten die bereits vorher angeführten Indices einwandfrei ermittelt werden.

Pyramidon- und Amidopyrin- (Dimethylamidoantipyrin-) Tabletten.

Die Undurchführbarkeit der Unterscheidung von Pyramidon und den damit chemisch identischen Präparaten unter den Namen Amidopyrin, Dimethylamidoantipyrin, Dimopyran mit den in dieser Veröffentlichung in den Bereich der Untersuchungen gezogenen Kennzahlen wurde bereits früher festgestellt. Als Beispiele von Tabletten mit diesen Substanzen als wirksamen Inhaltsstoff seien folgende angeführt:

Dimethylamidopyrin-Tabletten, Marke „Öster-

reichische Heilmittelstelle", à 0,30 g. Die zerkleinerten Tabletten bestehen unter dem Mikroskop aus wenig Stärke neben krümeligen Massen, die die Bestimmung des Brechungsvermögens bedeutend erschweren. Es fanden sich nur wenige Kristallschollen, an denen die Indices 1,514 und 1,64 einwandfrei zu beobachten waren. Ganz vereinzelte Kristallfragmente schienen einen etwas höheren Brechungsindex als 1,64, aber kleineren als 1,658 zu besitzen.

Als wichtigstes Erkennungsmerkmal zugleich mit dem höheren Index ist die Löslichkeit der Kristalle in hochprozentigen Gemischen von α-Monobromnaphthalin mit Paraffinöl, bezw. in reinem α-Monobromnaphthalin. Allerdings wird dadurch die Bestimmung des höheren Brechungsindex erschwert und unsicher, in Sublimaten mit zarteren Kristallbeschlägen infolge des raschen Lösungsvorganges unmöglich. Umkristallisieren der Substanz aus Wasser führte zur Bildung rechteckiger Platten und Prismen mit dem obgenannten Brechungsvermögen. Bei der Sublimation im Mayrhofer'schen Apparat bei einer Temperatur von 80 bis 90° entstanden zuerst Tröpfchen, nach Reiben des Beschlages mit der Nadel und Weitersublimieren entstanden rechtwinkelige Blättchen, rechtwinkelige und schiefwinkelige prismatische Kristalle und derbe Nadeln mit den gleichen Brechungsindices.

Bei den Pyramidon-Tabletten, Marke „Höchst", à 0,10 g, ergaben die analog durchgeführten Versuche die gleichen Ergebnisse wie vorher. Bei der Sublimation im Kempf'schen Apparat bei 65 bis 70° durch neun Stunden (Steighöhe zirka $^1/_2$ mm, also etwas höher als bei den früheren Versuchen; siehe A. Mayrhofer: Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte, II. S. 192) konnten jedoch Beschläge ohne Tröpfchenbildung erhalten werden.

Im Anschluß an die Untersuchung von einfachen Substanzen oder Gemischen in Form galenischer Zubereitungen wurde ein nach der sogenannten Prof. Marburg'schen Rezeptformel angefertigtes Gemisch von

Dimopyran
Phenacetin aa *30,0*
Coffein. natrio benzoic. *0,10*
Codein. muriatic. *0,02* der Prüfung mit den bei allen vorhergegangenen Versuchen angewendeten Methoden unterzogen.

Die in der Literatur niedergelegten Kennzahlen sind folgende:
Pyramidon (Amidopyrin):

Sublimationstemperatur, Methode MAYRHOFER: ca. 90°, Methode KEMPF: ca. 70° (nach achtstündigem Erhitzen), Brechungsindices: 1,517, ca. 1,64;

Phenacetin:

Sublimationstemperatur, Methode MAYRHOFER: 115—125°, Methode KEMPF: 70°,
Brechungsindices: 1,523, 1,532, 1,587;

Codeinum muriaticum:

Brechungsindices nach KLEY: 1,55, 1,62.

Das Pulver bestand, unter dem Mikroskop betrachtet, aus großen Kristallfragmenten, daneben fanden sich feine prismatische Kriställchen und grau opak erscheinende, aus kleinen Körnchen bestehende Klumpen, wie solche auch bei Coffeinum natriobenzoicum für sich beobachtet werden konnten. Zur Bestimmung des Brechungsvermögens waren diese Konglomerate nicht geeignet.

Die vorher angeführten Indices konnten an verschiedenen Kristallfragmenten beobachtet werden. Fragmente von Dimopyran- (Amidopyrin-) Kristallen waren außer an dem höchsten Index (zirka 1,64) an der Löslichkeit in der Einbettungsflüssigkeit Paraffinöl-α-Monobromnaphthalin leicht zu unterscheiden. Einzelne kleine, rechteckige Kristallnädelchen zeigten neben dem schwächeren Index 1,55, den höheren Index 1,62 (manche derartige kleine Kriställchen waren aber auch stärker brechend), nach einiger Zeit trat beim Liegen in der Einbettungsflüssigkeit Braunfärbung der Kriställchen ein. Diese Kriställchen zeigten dann einen Dichroismus braungelb (rötlichbraun) farblos. Die gleichen Verhältnisse konnten auch an reinem Codeinum muriaticum Ph. A. VIII beobachtet werden. Die Erkennung der Substanzen Phenacetin und Amidopyrin durch die Indices, besonders aber durch die Löslichkeit der letzteren Substanz in der Einbettungsflüssigkeit 1,64, die Erkennung des Codeinsalzes an der Bräunung mit Einbettungsflüssigkeiten mit hohem Gehalt an α-Monobromnaphthalin (1,62, bezw. 1,64) und die Unterscheidung der grobkörnigen, krümeligen Klumpen als Coffeinum natrio benzoicum war also auf diesem einfachen Wege möglich. Wegen des häufigen Wechselns und Schwankens der verhältnismäßig nahe beieinanderliegenden Indices dürfte es aber dennoch anzuraten sein, die beiden Hauptbestandteile durch Umkristallisieren aus Wasser zu isolieren. Die Versuche bestätigten die Durchführbarkeit dieses Trennungsver-

fahrens. Infolge der naheliegenden Grenzen der Intervalle der Sublimationstemperaturen und der bei Pyramidon häufig entstehenden tröpfchenförmigen Sublimate ist die Mikrosublimation für die rasche Trennung der beiden Hauptbestandteile in diesem Falle weniger geeignet.

Santonin.

Neben dem reinen Santonin kommen für den Apotheker als santoninhaltige Zubereitungen besonders noch Santonin-Tabletten und als Droge die *Flores Cinae* in Betracht.

Die offizinellen Pastilli Santonini mit 0,025 g Santonin boten unter dem Mikroskop im pulverisierten Zustande keine einwandfreien Anhaltspunkte zur Bestimmung des Brechungsvermögens der wirksamen Substanz, die ja auch nur als geringer Bruchteil (0,025 g Santonin und 1 g Zuckerpulver pro Pastille) neben dem Füllmaterial vorhanden ist. Als bestes Verfahren zur Isolierung des Santonins erwies sich die Sublimation. Bereits aus ganz geringen Mengen (0,01 g der pulverisierten Pastille) konnten kristallinische, für die Bestimmung des Brechungsvermögens geeignete Beschläge erhalten werden. Die im Kempf'schen Apparat nach 18 Stunden bei 120 bis 130° erhaltenen Sublimate bestanden aus rechteckigen und quadratischen Einzelkristallen (siehe A. Mayrhofer: Mikrochemie der Arzneimittel und Gifte, II. Tafel XV. Fig. 2), die die bereits in der Literatur angegebenen Indices 1,592, 1,639 und besonders häufig 1,589 zeigten.

Bei den aus *Flores Cinae* erhaltenen Sublimaten schlugen jedoch auch wiederholte Versuche, durch Umkristallisieren zur Bestimmung des Brechungsvermögens brauchbare Kriställchen zu bekommen, bisher fehl.

Im Anschluß an Santonin sei ein mit dieser Substanz zusammenhängender gerichtlicher Fall mitgeteilt, bei dem es sich darum handelte, eventuell vorhandene Spuren von Santonin, die möglicherweise an Gebrauchsgegenständen haften geblieben waren, nachzuweisen. Um das Santonin erfassen zu können, wurde zunächst mit Alkohol quantitativ extrahiert und diese Alkoholauszüge dann im Vakuum abdestilliert. Es blieb eine kleine Menge eines braungefärbten Rückstandes, von dem eine Probe der Sublimation nach der Methode Mayrhofer unterworfen wurde. Bei 100 bis 110° (es wurde auch bis 120° erhitzt) entstand ein Sublimat,

das neben Tröpfchen aus feinen Nadeln bestand, also einer Kristallform, die bei Santonin erfahrungsgemäß nicht vorkommt. Die Nadeln waren außerdem im Gegensatz zu Santonin in Wasser leicht löslich.

Wurde der braune Rückstand der Alkoholextraktion mit Chloroform aufgenommen, in dem sich Santonin sehr leicht löst, und diese Chloroformlösung nach Filtration abgedunstet, so gab dieser Rückstand bei der Sublimation nur tröpfchenförmige Beschläge, die sich auch durch Reiben mit einer Nadel oder durch Umlösen mit Chloroform und Fortsetzung der Sublimation nicht in eine kristallinische Form bringen ließen. Die mikrochemischen Reaktionen auf Santonin waren sowohl beim nadelförmigen wie beim tröpfchenförmigen Sublimat negativ.

Es wurde nun versucht, die bei der Sublimation des Alkoholrückstandes erhaltenen Nadeln mit Hilfe des Schmelzpunktes und der Brechungsindices zu charakterisieren. Tröpfchenfreie Sublimate konnten dadurch erhalten werden, daß die zuerst gewonnenen Sublimate im Apparat von MAYRHOFER nochmals vorsichtig sublimiert wurden. Die Bestimmung des Schmelzpunktes gestaltete sich jetzt sehr einfach, da das Deckgläschen mit dem reinen Sublimat hierzu bloß zwischen die Glasplatten des MAYRHOFER'schen Apparates gelegt werden mußte. Die Nadeln schmolzen bei 132°. Der Schmelzpunkt, das nadelförmige Sublimat, die leichte Löslichkeit in Wasser und die Unlöslichkeit in Chloroform ließen wohl vermuten, um welche Substanz es sich hier handeln konnte; die einwandfreie Bestätigung ergab die Bestimmung der Brechungsindices der tröpfchenfreien Sublimate. Die Nadeln verlöschten in einer Auslöschungsrichtung bei Verwendung der Einbettungsflüssigkeit mit dem Brechungsindex 1,485, in der anderen Auslöschungsrichtung verlöschten sie in der Einbettungsflüssigkeit mit dem Index 1,60 (in beiden Fällen Gemische von Paraffinöl und α-Monobromnaphthalin). Dies sind aber die Indices für Harnstoff[11]), von dem sich eben Spuren auf den untersuchten Gegenständen befunden hatten.

Wenn auch das Ergebnis dieser Untersuchung unvermutet und überraschend war, so wurde doch der Beweis erbracht, daß die Bestimmung der Brechungsindices einer unbekannten, in dem erwähnten Falle entschieden nicht erwarteten Substanz auch dann

[11]) MAYRHOFER A., Pharmazeut. Monatshefte 1926, Nr. 4 bis 7.

noch positive Ergebnisse liefern kann, wenn infolge zu geringer Mengen der zu charakterisierenden Substanz andere Nachweismethoden versagen.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Arbeit wird nach Besprechung der allgemeinen Gesichtspunkte über die Anwendungsmöglichkeiten der in derselben benützten mikrochemischen Prüfungsverfahren (vorwiegend Sublimation und Bestimmung der Brechungsindices) an der Hand von Beispielen aus der Praxis die Verwertung dieser Methoden an reinen Substanzen sowie auch an Gemischen und pharmazeutischen Zubereitungen gezeigt. Im Anschluß an Santonin wurde eine gerichtlich chemische Untersuchung als Beispiel angeführt, bei der nicht Santonin, wohl aber mit Hilfe der geschilderten Methoden Harnstoff in ganz geringen Mengen einwandfrei nachgewiesen werden konnte.

Nachweis und Messung kleinster Magnesiummengen.

Von **Friedrich L. Hahn.**

(Aus dem chem. Institut der Universität Frankfurt a. M.)

(Eingelangt am 8. Juni 1929.)

Vorblick.

Mengen von einigen Mikrogramm Magnesium können kolorimetrisch mit guter Genauigkeit bestimmt werden; das hierfür ausgearbeitete Verfahren der „Stufenkolorimetrie" gestattet allgemein kolorimetrische Bestimmungen mit einfachsten Hilfsmitteln und dabei recht genau durchzuführen. Magnesiummengen bis herab zu 0,001 γ können noch erkannt und mit einiger Genauigkeit abgeschätzt werden; hierfür wird eine einfach herzustellende Vorrichtung beschrieben, mit der Tropfen von etwa 1 ccm Inhalt abgemessen werden können, und eine ebenfalls einfach herzustellende Zentrifuge für Reaktionskapillaren.

Vor einiger Zeit habe ich gemeinsam mit H. Wolf und G. Jäger einen höchst empfindlichen Farbnachweis für Magnesium angegeben[1]): Die rotviolette alkalische Lösung des 1,2,5,8-Tetra-oxy-anthrachinons wird durch Magnesium nach kornblumenblau umgefärbt. Es konnte 1 γ (0,5 γ) Mg[2]) in 1 ccm sicher erkannt werden. Es sollte weiterhin erprobt werden, ob sich diese Reaktion auch zur Messung so kleiner Magnesiummengen eignet, wenn ja, ob sie eine einfache Bestimmung kleinster Magnesiumgehalte in Aluminiumlegierungen ermöglicht, und schließlich, wie weit die Erfassungsgrenze durch Übergang zu mikrochemischer Arbeitsweise herabgedrückt werden kann. Über den Erfolg dieser Untersuchung wird im folgenden berichtet.

Der Farbton der magnesiumhaltigen Lösung setzt sich aus dem Rotviolett der alkalischen Farbstofflösung und dem Blau des Magnesium-Farblacks zusammen. Der Farblack flockt bei größeren Konzentrationen aus; die magnesiumfreie, natronalkalische Lösung ist nicht unverändert haltbar. Es ist deshalb ausge-

[1]) Ber. deutsch. Chem. Ges. 57 (1924), 1394.

[2]) Ich konnte an mir selbst und an verschiedenen meiner Mitarbeiter die Beobachtung machen, daß sich das Unterscheidungsvermögen für Farbtöne merklich bessert. Wir konnten 0,5 γ sicher erkennen; 1 γ wurde auch von ungeübten Beobachtern normaler Farbempfindlichkeit stets sofort als verschieden von der Blindprobe angesprochen; selbstverständlich wurden alle derartigen Prüfungen so ausgeführt, daß der Prüfer eine größere Zahl von Proben unbekannten Inhaltes in gleich und verschieden gefärbte ordnete.

schlossen, den Farbton der magnesiumhaltigen Lösung etwa in einem Keilkolorimeter zu bestimmen. Man muß vielmehr die zu messende Lösung, kurz „Probe" genannt, und Maßlösungen bekannten Magnesiumgehaltes gleichzeitig mit Farbstoff und Natronlauge versetzen und nun die Probe in die Reihe der Maßlösungen einordnen. Jetzt ist, auch wenn die Farbstofflösung in ihrem Gehalt nicht genau festgelegt ist, doch das eine gewährleistet, daß alle verglichenen Proben gleich zusammengesetzt sind, und es war nur noch zu prüfen, ob in einem nicht zu kleinen Gebiete der Konzentration der Farbton mit mäßigen Unterschieden im Magnesiumgehalt merklich schwankt. Diese Bedingung ist erfüllt.

Man kann die zu prüfenden Lösungen einfach in Reagensgläsern gegen einen gleichmäßig beleuchteten, am besten mit Aluminiumbronze gestrichenen Hintergrund vergleichen, oder auch in einem Kolorimeterblock, wie er zur Bestimmung von P_H nach MICHAELIS verwendet wird, mit oder ohne Vorschaltung einer Gelbscheibe; bei welchem Verfahren die Unterschiede am schärfsten erkannt werden, hängt ein wenig von dem persönlichen Farbempfinden des Prüfers ab. Aus diesem Grunde wird jeder Beobachter auch die Farbstoffmenge, mit der er die Unterschiede in einem bestimmten Gebiet am besten sieht, selbst etwas erproben müssen. Wir verwendeten (für Gehalte von etwa 0,5 bis 10 γ/ccm) auf 1,5 ccm Analysenlösung 0,5 ccm 2n-NaOH und 0,2 ccm Farblösung der folgenden Zusammensetzung: 0,1 g Farbstoff werden mit 5 g kristallisiertem Natriumacetat innig verrieben und von diesem Gemisch 0,1 g in 20 ccm 96%igen Alkohols gelöst. Die Lösung ist lange haltbar.

Das Gebiet stärkster Farbänderung liegt zwischen 5 und 12 γ Magnesium in der ganzen Probe (3 bis 8 γ/ccm); in diesem Gebiete können um je 1 γ steigende Stufen leicht unterschieden werden. Die Prüfung wird aber wesentlich erleichtert, wenn man die Maßlösungen um den doppelten Betrag, also um 2 γ, auseinanderhält und nun die Probe entweder einer der Maßlösungen gleichsetzt oder sie als gerade zwischen zwei Maßlösungen liegend anspricht. Diese Entscheidung läßt sich fast immer mit Sicherheit auf den ersten Blick treffen; fühlt man sich unsicher, so sehe man von den Proben fort, um das Auge ausruhen zu lassen, und dann von neuem hin. Kann man sich auch dann nicht entscheiden (das wird nur recht selten vorkommen), so wertet man die Probe

zu einer Viertelstufe, also z. B., wenn man nicht recht entscheiden kann, ob sie gleich 6 oder zwischen 6 und 8 (das heißt gleich 7) anzusetzen ist, dann setzt man sie gleich 6,5.

Auf diese Weise kann mühelos eine Abschätzung der einzelnen Probe erreicht werden, die auf 10 bis 20% der vorhandenen Menge genau ist; durch einen ganz einfachen Kunstgriff läßt sich das Verfahren aber so ausgestalten, daß es zu einer Messung mit wesentlich kleinerem Fehler wird. Schätzt man nämlich nicht eine, sondern mehrere Proben in solchen Gehaltsstufungen, daß die Schätzungsfehler das Ergebnis abwechselnd erhöhen und erniedrigen, so muß der Mittelwert dieser Schätzungen von Abrundungsfehlern weitgehend befreit sein. Eine der möglichen Ausführungsformen dieses Verfahrens ist die folgende:

Von einer Stammlösung, die 10 γ Mg in 1 ccm enthält, mißt man 0,6, 0,8 und 1 ccm ab und bringt die Mengen mit destilliertem Wasser auf 1,5 ccm. Dies ergibt drei Maßlösungen von 6, 8 und 10 γ Mg. Von der zu prüfenden Lösung mißt man, wenn sie völlig unbekannt ist, zunächst 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 und 1,5 ccm ab, bringt alle Proben mit destilliertem Wasser auf 1,5 ccm, gibt erst in alle Röhren Farbstoff und dann Natronlauge[3]) und vergleicht; man erhält so die erste Schätzung für Gehalte zwischen 4 und 100 γ Mg je ccm. Nun mißt man einige Proben ab, die nach dieser Schätzung ziemlich gleichmäßig verteilt über das Gebiet von 6 bis 10 γ Mg liegen, vergleicht diese mit neuen Maßlösungen, wiederholt das, wenn größere Genauigkeit verlangt ist, mit weiteren Proben und bildet aus allen Werten das Mittel[4]). Um zu zeigen, wie rasch hierbei die Fehler verschwinden, die durch Abrundung auf feste Stufen entstehen, sei zunächst angenommen, daß sonstige Fehler nicht vorkommen, daß also jede Probe immer der nächstgelegenen Stufe (Stufe = Gehalt einer Maßlösung oder Mittelwert zwischen zwei benachbarten Gehalten) zugeordnet wird.

[3]) Nach dem Zusatz der Natronlauge verändern die Lösungen allmählich ihren Farbton durch Reifen des Farbstoffes; gibt man in eine Reihe von zehn Röhren aus einer Meßpipette oder Bürette rasch hintereinander die Lauge, so ist der geringe Zeitunterschied zwischen erstem und letztem Röhrchen nach fünf Minuten bedeutungslos geworden, und man kann nun vergleichen, ebenso auch nach längerer Wartezeit. Man darf aber nicht etwa frisch angesetzte Proben mit einige Zeit vorher angesetzten Meßröhren vergleichen.

[4]) Man kann auch die gleichen Proben in drei weitere Meßröhren von 5, 7 und 9 γ einordnen, die man gleich von vornherein mit ansetzt.

I. Gehalt der Lösung 5,8 γ/ccm.

Probe Nr.	Volumen der Probe cm³	Gehalt γ	Schätzung γ in der Probe	Schätzung γ in 1 cm³
1)	1,5	8,7	9	6,0
2 a)	1,0	5,8	6	6,0
b)	1,1	6,4	6 oder 7	5,5 oder 6,4
c)	1,2	7,0	7	5,8
d)	1,3	7,5	7 oder 8	5,4 oder 6,2
e)	1,4	8,1	8	5,7

Mittel: 5,7 oder 5,9 oder 6,0.

II. Gehalt der Lösung 9,7 γ/ccm.

Probe Nr.	Volumen der Probe cm³	Gehalt γ	Schätzung γ in der Probe	Schätzung γ in 1 cm³
1)	0,8	7,8	8	10,0
2 a)	0,6	5,8	6	10,0
b)	0,7	6,8	7	10,0
c)	0,9	8,7	9	10,0
3 a)	0,65	6,3	6	9,2
b)	0,75	7,3	7	9,3
c)	0,85	8,2	8	9,4
d)	0,95	9,2	9	9,5

Mittel: 9,68.

Bemerkungen. Die Proben 2 b und 2 d des ersten Beispieles liegen sehr nahe an Viertelabständen; um zu zeigen, wie wenig eine falsch geschätzte Probe ausmacht, sind sie nicht als schwer erkennbar angenommen und Viertelwerten zugeordnet worden, sondern willkürlich den benachbarten Stufen. Die angegebenen Mittelwerte beziehen sich also auf die drei Möglichkeiten, daß beide Proben zu niedrig, eine zu niedrig und eine zu hoch oder beide zu hoch eingeordnet wurden. — Beim zweiten Beispiel ist die vollkommene Übereinstimmung der ersten vier Messungen als Warnung aufzufassen, die eine weitere Meßreihe erforderlich macht; eine derartige Übereinstimmung ist nur dann möglich, wenn alle Abrundungsfehler nach einer Richtung liegen.

Selbstverständlich kann eine derartige Genauigkeit bei der praktischen Messung nicht immer erreicht werden, da hier noch tatsächliche Fehler im Farbton der einzelnen Lösungen auftreten müssen (das heißt Abweichungen zwischen dem Farbton, den die Lösungen ihrem Gehalt nach haben sollten und den sie wirklich haben), veranlaßt durch Meßfehler, ungleichmäßiges Reifen des

Farblackes usw. Aber auch diese Fehler verteilen sich regellos streuend auf die Einzelmessungen, vergrößern also ihre Abweichung vom Mittelwert, bewirken somit, daß eine größere Zahl von Einzelmessungen zur Erzielung einer bestimmten Genauigkeit erforderlich ist, verschieben aber den Mittelwert nicht. Es seien zunächst einige Analysen angeführt, die nach einem weniger systematischen Vergleichsverfahren mit zwei oder drei Proben erhalten wurden[5]), und dann vier Messungen genau nach der oben beschriebenen Art. In allen Fällen war, um Selbsttäuschungen zu vermeiden, dem Prüfenden der Gehalt der Lösungen unbekannt.

Analyse Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Gehalt	7,2	9,7	10,5	11,1	12,3	14,0	18,0	22,0	24,0	24,0	γ/ccm
Gefunden	9	9	11	10	13	13	16,5	23	25	22	γ/ccm
Fehler	+ 20	− 8	+ 5	− 11	+ 7	− 8	− 10	+ 5	+ 4	− 10	% der vorh. Menge

Messung A.

Volumen der Probe	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2 ccm
Schätzung der Probe	7	7	8	9	10 γ
Also in 1 ccm	8,8	7,8	8,0	8,2	8,3 γ

Mittel: 8,2. Gehalt: 8,0 γ/ccm. Fehler: + 2,5%.

Messung B.

Volumen der Probe	0,8	1,0	1,2	1,4 ccm
Schätzung der Probe	6	7	8,5	10 γ
Also in 1 ccm	7,5	7,0	7,1	7,1 γ

Mittel: 7,2. Gehalt: 7,2 γ/ccm.

Messung C.

Volumen der Probe	0,9	1,1	1,3	1,5 ccm
Schätzung der Probe	6	7	8,5	10 γ
Also in 1 ccm	6,7	6,4	6,5	6,7 γ

Mittel: 6,6. Gehalt: 6,4 γ/ccm. Fehler: + 3,4%.

Messung D.

Volumen der Probe	1,10	1,15	1,20	1,25	1,30	1,35	1,40	1,45	1,50 ccm
Schätzung der Probe	6	6	7	8	7	8	8,5	8	7 γ
Also in 1 ccm	5,5	5,2	5,8	6,4	5,4	5,9	6,1	5,5	4,7 γ

Mittel: 5,6. Gehalt: 5,6 γ/ccm.

Besonders eindrucksvoll ist die letzte Reihe: Hier ist durch die unvermeidlichen Arbeits- und Schätzungsfehler die vierte Probe

[5]) Vergl. die Dissertation von HELMUT MEYER, Frankfurt a. M. 1927.

um eine Stufe und die letzte um eineinhalb Stufen falsch eingeordnet worden, was bei den kleinen Gehalten für die Einzelmessung eine sehr große Abweichung ergibt, aber dieser Fehler fällt aus dem Mittelwert völlig heraus. Läge nun durch einen ungünstigen Zufall bei beiden besonders falschen Schätzungen die Abweichung im gleichen Sinne, wäre also die letzte Probe nicht auf 7, sondern auf 10 geschätzt worden, dann ergäbe sich für sie 6,7 und als Mittelwert 5,8 γ/ccm, also immer noch nur ein Fehler von 3,6% der vorhandenen Menge.

Um in dieser Weise Magnesium im Aluminium bestimmen zu können, wurde zunächst erprobt, wieviel Aluminium neben Magnesium vorhanden sein kann, ohne daß der Farbton der Lösung verändert wird[6]); das Grenzverhältnis wurde zu 2,5 Gewichtsteilen Aluminium auf 1 Teil Magnesium gefunden. Indem man aus wässeriger Lösung durch Einleiten von HCl-Gas $AlCl_3 . 6\,H_2O$ ausfällt, kann man von Legierungen, die 0,5% Magnesium oder mehr enthalten, in einfachster Weise zu Lösungen kommen, die nicht mehr als 2 Teile Al auf 1 Teil Mg enthalten, also kolorimetriert werden können; fällt man mit Äther-Salzsäure, so kann man noch Legierungen bis herab zu 0,05% Magnesium genügend anreichern[7]).

Arbeitsweise. 5 g Legierung werden in 2n-Salzsäure gelöst und auf 200 ccm aufgefüllt. Davon werden 40 ccm in einem Maßkolben von 50 ccm unter Eiskühlung mit HCl-Gas gesättigt und mit eisgekühlter rauchender Salzsäure aufgefüllt. Die Lösung wird durch eine trockene Glasnutsche in ein trockenes Röhrchen gesaugt und aus diesem werden mit einem passenden Stechheber 5 bis 10 ccm entnommen (Vollpipette mit kurzer Auslaufspitze und einer Marke dicht über dem Bauch; der Inhalt wird durch Auswägen oder Auslaufenlassen in eine Bürette festgestellt). Diese werden auf dem Wasserbad zur Trockne gedampft, der Rückstand wird zu 100 ccm gelöst und die Lösung wie oben beschrieben gemessen. Findet man hierbei den Magnesiumgehalt zu klein, so wird eine zweite Probe mit Äther-Salzsäure gefällt.

20 ccm der ersten Lösung werden mit 20 ccm Äther in einen Maßkolben von 50 ccm gebracht und unter Eiskühlung mit HCl-Gas gesättigt, indem dieses in kräftigem Strom in die wässerige

[6]) Aluminium färbt, wie bei der Atackschen Probe, nach rot hin, täuscht also, wenn es in zu großer Menge vorhanden ist, zu wenig Magnesium vor.

[7]) Einzelheiten enthält die Dissertation von Meyer.

Schicht geleitet wird. (Ist das Einleitungsrohr eng und der Gasstrom lebhaft genug, so läßt sich ein Rücksteigen sicher vermeiden; das $AlCl_3 \cdot 6\,H_2O$ fällt bei dieser Arbeitsweise körnig und frei von Magnesium aus.) Nach der Sättigung füllt man mit Äther auf, saugt bei schwachem Minderdruck ab, entnimmt dem Filtrat zwei Füllungen des Stechhebers, verdunstet diese und verfährt weiter wie oben.

Das Verfahren wurde an Gemischen genau eingestellter Lösungen von reinstem (mehrfach mit HCl umgefälltem) $AlCl_3 \cdot 6\,H_2O$ und $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ erprobt; die angewandten und die gefundenen Magnesiummengen sind als Prozente der Gesamtmetallmenge gegeben. Angew.: 5, gef.: 5,0, 4,8, 5,2%. — Angew.: 2, gef.: 2,1, 1,8%. — Für 1—0,90, 1,05%. — Für 0,5—0,40, 0,48, 0,505, 0,47, 0,50, 0,46, 0,43%. — Für 0,25—0,23, 0,24, 0,23%. — Für 0,20—0,22%. — Für 0,17—0,17, 0,18%. — Für 0,14—0,15%. — Für 0,12—0,13%. — Für 0,10—0,096, 0,096, 0,110%.

Schon früher ist von anderer Seite nachgewiesen worden[8]), daß man aus Kupfer-Zink-Legierungen diese Metalle durch H_2S abscheiden und im Filtrat das Magnesium kolorimetrisch schätzen kann; nachdem dies jetzt auch für Aluminium gilt, liegt ein allgemein gangbarer Weg vor. Die Abscheidung des Aluminiums durch Chlorwasserstoff ist seit langem bekannt; sie ist aber erst jetzt praktisch verwertbar geworden, nachdem so kleine Mengen Magnesium bestimmt, also auch nur kleine Mengen Aluminium gefällt zu werden brauchen. Daß die anzuwendenden Mengen, sobald dies notwendig erscheinen sollte, noch beträchtlich verkleinert werden können, ergibt sich aus der oben gegebenen Arbeitsvorschrift ohne weiteres.

Nachweis allerkleinster Magnesiummengen.

Der Farbumschlag der alkalischen Anthrachinonlösung auf Zusatz von Magnesium ist auch dann noch überaus deutlich, wenn man Mikrotröpfchen der Lösungen in Kapillaren vermischt; man sollte also ganz außerordentlich kleine Magnesiummengen erkennen und durch Vergleich mit bekannten Lösungen abschätzen können, wenn es nur gelänge, Tröpfchen von etwa 1 ccm Inhalt mit einiger Genauigkeit abzumessen und zu mischen. Nun sind

[8]) Schürmann und Schob, Chemiker Ztg. 49 (1926), 625.

hier eine ganze Reihe von Lösungen abzumessen: Farbstoff, Lauge (diese beiden allenfalls im Gemisch), Probe und Maßlösungen; wollte man hierfür je eine der bekannten Mikrobüretten oder -pipetten verwenden, so würde die erforderliche Apparatur umständlich und teuer. Anderseits ist es hier gar nicht erforforderlich, das Volumen der Tröpfchen sehr genau zu kennen; es genügt, daß alle verwendeten Tröpfchen gleich groß sind. Dies legte den Gedanken nahe, für alle Lösungen eine einzige Meßvorrichtung zu verwenden, die mit auswechselbaren Saugröhrchen, je einem für jede einzelne Lösung, versehen werden kann. Die im folgenden beschriebene Vorrichtung genügt allen diesen Anforderungen und kann aus einigen Stückchen Glasrohr in wenigen Minuten hergestellt werden.

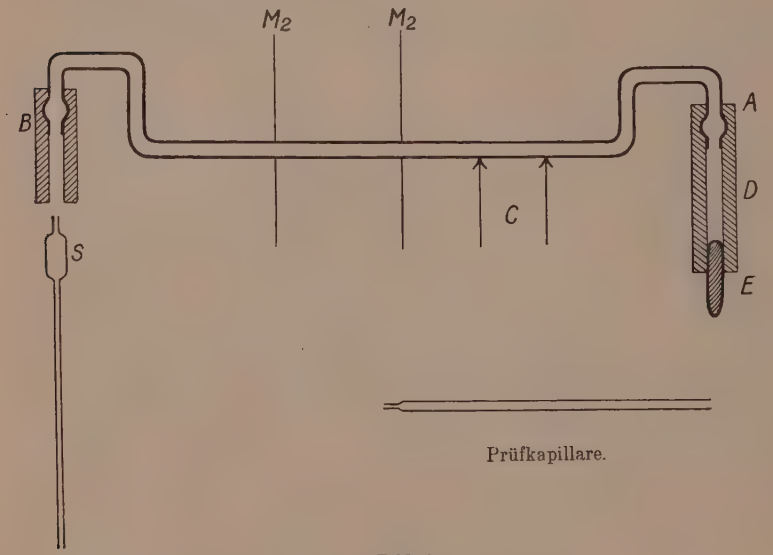


Bild 1.
Abmeßvorrichtung für Mikrotröpfchen.
ca. nat. Gr

Die Meßröhre A-M_1-M_2-B stellt man aus einem dickwandigen Rohr von etwa 1 mm lichter Weite durch Ausziehen her; hat sie im mittleren Teil etwa 0,2 mm im Lichten, so ist 1 cmm rund 3 cm lang. Bei B können die Saugröhrchen angesetzt werden, bei A ist die Röhre durch einen Gummischlauch D mit eingeschobenem

Glasstab E verschlossen. Im rechten Teil der Röhre, ungefähr zwischen den Pfeilen bei C, befindet sich ein Tröpfchen Quecksilber. (Man bringt es bei A ein und treibt es, indem man den am freien Ende offenen Schlauch D mit den Fingern verschließt, zusammendrückt, erst am Ende und dann in der Mitte losläßt und dieses Verfahren nach Bedarf wiederholt, so weit in die Röhre, daß nach Einschieben des Glasstabes das Quecksilber noch einen genügenden Abstand von M_1 hat.) Die Marken M_1 und M_2, die das abzumessende Volumen eingrenzen, sind Striche auf einem Kartenblatt, das irgendwie (z. B. mit übergeschobenen Drahtklammern) an der Röhre befestigt wird; welchen Abstand sie haben müssen, um ein bestimmtes Volumen einzuschließen, kann man annähernd ermitteln, indem man die Röhre ohne und mit Quecksilbertröpfchen wägt und die Länge des Tröpfchens mißt. Will man die Tropfengröße genau ermitteln, was, wie erwähnt, hier nicht nötig ist, so wägt man eine Anzahl Tropfen aus. Natürlich kann man auch für eine Meßröhre Karten mit mehreren Marken verschiedenen Abstandes für Tropfen wechselnder Größe vorrätig halten; man muß dann nur an jeder Karte und an der Röhre je ein Zeichen anbringen, die beim Wechseln stets zur Deckung kommen, für den Fall, daß die Röhre nicht überall gleich weit ist. Die Meßröhre wird zum Gebrauch bei A und B eingespannt.

Zum Abmessen einer Lösung setzt man das zugehörige Saugrohr S bei B an, treibt durch Druck auf das Quecksilber über M_2 hinaus, saugt durch Loslassen von D die Lösung ein, wobei das Quecksilber wieder über M_1 nach rechts gehen muß. Nun treibt man durch Druck auf D das Quecksilber so weit, daß sein vorderes Ende M_1 berührt, tupft die Spitze von S auf einem Filter ab, treibt das Quecksilber bis an M_2 und berührt die Spitze von S mit dem ausgezogenen Ende der Prüfkapillare (Bild 1), die den Tropfen sofort aufsaugt. Man füllt eine Reihe von Prüfkapillaren zunächst mit dem Reagens, dann läßt man in jede in gleicher Weise einen Tropfen der zu vergleichenden Lösungen eintreten und schmilzt die feine Spitze in der Mikroflamme zu; zum Aufbewahren kann man nun auch das andere Ende abschmelzen.

Haben die Tröpfchen einen Inhalt von 1 cmm und sind die Prüfkapillaren 1 mm im Lichten, so ergibt die Mischung zweier Tröpfchen eine Länge von 8 mm; derartige Proben kann man sehr gut vergleichen.

Als Reagens wurde 0,1 g Farbstoffgemisch (Farbstoff + Na-

triumacetat = 1 + 5) in 10 cmm norm. NaOH verwandt: die Lösung hält sich etwa einen Tag.

Sicher unterscheidbar waren in 1 ccm Lösung: 0, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 usw. γ Mg; ein einigermaßen geübter Beobachter kann gut noch Zwischenstufen einschalten; es macht auch keine Schwierigkeiten, mit der Tropfengröße noch merklich unter 1 cmm herabzugehen, nur muß man, wenn die Tröpfchen sehr klein werden, bei der Anfangseinstellung das Saugröhrchen nicht mit einem Filter, sondern mit einem der Prüfkapillare gleichen Abtupfröhrchen berühren. Daß man bei kleineren Tröpfchen die Prüfkapillaren enger wählt, ist selbstverständlich; bei 0,1 cmm Tröpfchengröße ergeben zwei Tropfen in einer Kapillare von 0,4 mm Weite eine Länge von 5 mm.

Bei dem Versuch, mit derartigen äußerst kleinen Tropfen zu arbeiten, ergaben sich nun Schwierigkeiten anderer Art. In sehr verdünnten Lösungen reift der Farblack etwas langsam, und als entsprechend den Erfahrungen bei der Makroprobe versucht wurde, durch Erwärmen und Zentrifugieren der Kapillaren die Probe empfindlicher zu gestalten, zeigten sich stets in allen Röhrchen Flockungen. Zwar waren sie in der Blindprobe (Reagens + ein Tröpfchen Wasser, frisch am Platinspatel kondensiert) gering und rotviolett, mit 0,005 γ Mg stärker und blau gefärbt, aber es war ohne weiteres klar, daß man eine noch wesentlich empfindlichere und sicherere Reaktion bekommen müßte, wenn es nur gelänge, die Blindprobe völlig niederschlagsfrei zu erhalten. Das schien anfangs fast aussichtslos, da selbst zentrifugierte Lösungen beim Überführen des klaren Anteiles in eine neue Kapillare, erneutem Erhitzen und Zentrifugieren wieder Flockungen geben; offenbar wird die Glasoberfläche, die ja hier im Verhältnis zum Volumen recht groß ist, von der alkalischen Lösung angegriffen. Dann aber zeigte sich, daß es nicht nötig ist, die Röhrchen zu erhitzen; der Farblack setzt sich auch beim Zentrifugieren in der Kälte vorzüglich ab. Damit ist sofort der Weg, und zwar ein außerordentlich einfacher Weg zu einer einwandfreien Blindprobe gegeben, viel einfacher und zuverlässiger, als etwa sorgfältigstes Reinigen des Farbstoffes und Verwenden von Soda aus Bikarbonat an Stelle der kaum völlig magnesiumfrei zu erhaltenden Natronlauge: Man zentrifugiert ein Röhrchen, das nur Reagens enthält, trennt die Spitze des Röhrchens mit dem Sediment ab, saugt die zu prüfende Lösung ein, schmilzt zu und zentrifugiert von neuem.

Nun zeigte sich nur noch, daß bei starkem Verdünnen mit Wasser das Reagens ein wenig nachflockt; diese Störung läßt sich vermeiden, wenn das Volumen an Reagens gegenüber dem der Lösung groß ist, und da der Niederschlag durch Zentrifugieren gesammelt wird, ist das gut möglich. Man erhält so völlig niederschlagsfreie Blindproben und eine ganz niedere Erfassungsgrenze.

Das Zentrifugieren der Röhrchen ist, wenn man nur eine Handzentrifuge zur Verfügung hat und es bei einigen hundert Proben eigenhändig ausführen soll, eine ziemlich lästige Arbeit: ich habe mir also eine Motorzentrifuge selbst gebaut, die so einfach und wirksam ausgefallen ist, daß sie vielfacher Anwendung fähig scheint. Man braucht nur einen Elektromotor kleinsten Formates, der mit senkrechter Achse läuft, oder ein Rührstativ oder dergleichen. Auf die Achse wird, falls sie glatt ist, ein Gummischlauch aufgeschoben und um diesen der mittlere Teil des Drahtes verdrillt, der vorher schon, wie im Bild 2 gezeichnet, mit einer

Bild 2.
Zentrifuge.
ca. nat. Gr.

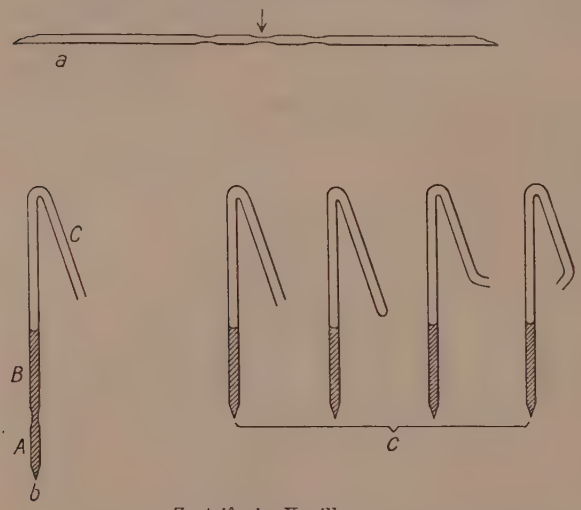
Von außen nach innen: Draht, Gummischlauch, Achse.

Schlinge an jedem Ende zusammengedreht wurde. (Trägt die Achse eine Schnurrolle, so kann der Gummischlauch natürlich wegbleiben.) In die Ösen an den Enden werden Kapillaren der im Bild 3 gezeichneten Form einfach eingehängt.

Der Nachweis gestaltet sich nun wie folgt: Kapillaren von 0,3 bis 0,4 mm lichter Weite und etwa 15 cm Länge werden in der Mitte so ausgezogen, wie es Bild 3a zeigt, und dann an der durch den Pfeil bezeichneten Stelle auseinandergebrochen. Man läßt nun durch die Spitze Reagens einsteigen (zirka 5 mg Oxyanthrachinon in 2 ccm normal NaOH), schmilzt die Spitze ab, läßt in der Mikroflamme den oberen Teil der Röhre durch die eigene Schwere so abknicken, wie in Bild 3b gezeichnet, und zentrifugiert kurz. Zeigt sich nun bei Betrachtung unter dem Mikroskop, daß ein Luftbläschen im verengten Teil hängt, so kann man dieses leicht entfernen, indem man die Kapillaren von A nach B streifend an der Mikroflamme vorbeiführt. Man zentrifugiert dann weiter, bis der Niederschlag in A zusammengedrängt ist und B völlig klar

und rötlich erscheint. Nun bricht man an der Einschnürung zwischen A und B durch, läßt Probelösung eintreten, schmilzt zu und zentrifugiert von neuem; nach längstens fünf Minuten kann man die Röhrchen unter dem Mikroskop prüfen. Man kann eine ganze Schar Röhrchen gleichzeitig in eine Öse der Zentrifuge einhängen; um sie zu unterscheiden, läßt man das freie Ende von C verschiedenartig zuschmelzen oder ein wenig umbiegen, vergleiche Bild 3c.

Bild 3.
Länge: ca. nat. Gr. Breite: 4—5mal vergrößert.



Zentrifugier-Kapillaren.
a) Mittelteil einer Kapillare vor dem Auseinanderbreiten.
b) Kapillare mit Reagens.
c) Kapillaren mit Reagens und verschiedenen Lösungen, durch verschiedene Ansätze gekennzeichnet. Durch Zuschmelzen der freien Enden können aus den beiden letzten Formen nochmals zwei neue erhalten werden.
ca. nat. Gr.

Bei einer Weite von 0,3 bis 0,4 mm hat 0,1 cmm eine Länge von 3 bis 4 mm; es gelingt also leicht, $^1/_{20}$ bis $^1/_{40}$ von 1 cmm einzusaugen. Die blinde Probe mit frisch an einem Platinspatel kondensiertem Wasser blieb nun in allen Fällen völlig frei von Niederschlag; bei einem Gehalt von 0,01 γ/ccm zeigte sich manchmal, aber nicht immer, eine Spur Niederschlag, bei 0,02 γ/cmm stets eine deutlich erkennbare Abscheidung, auch wenn eine ganz minimale Menge Lösung eingesaugt wurde. Die Erfassungsgrenze ist

also sicher niedriger als 0,001 γ. Steigerung der Konzentration auf das jeweils Doppelte der vorangegangenen Lösung ergibt sehr deutliche Unterschiede der Niederschlagsmengen; bei einiger Übung sind Zwischenstufen erkennbar. Alle Niederschläge sind rein blau.

Sehr interessant ist noch eine Zusammenstellung von Erfassungsgrenze und Konzentrationsempfindlichkeit bei Ausführung der Probe im Reagensrohr, in der Farbkapillare und im Zentrifugierröhrchen, wobei überall die Werte eingesetzt sind, die sich ohne besondere Schwierigkeit und sicher erkennen lassen. Sie zeigt, wie man das ja gewohnt ist, daß zunächst die Verkleinerung der Erfassungsgrenze mit einem merklichen Sinken der Konzentrationsempfindlichkeit erkauft wird. Während die Erfassungsgrenze auf $^1/_{50}$ sinkt, steigt die Mindestkonzentration auf das Zwanzigfache. Der Übergang zum Zentrifugieren aber stellt eine so wesentliche Verbesserung der Ausführungsform dar, daß nun die Erfassungsgrenze nochmals auf $^1/_{20}$ sinkt, ohne daß die Empfindlichkeit weiter vermindert wird.

	Reagensglas	Farbkapillare	Zentrifuge
Erfassungsgrenze . .	1 γ	0,02 γ	0,001 γ
Gelöst in	1 ccm	1 cmm	0,05 cmm
Empfindlichkeit . . .	10^{-6}	$2{,}10^{-5}$	$2{,}10^{-5}$

Kurze Mitteilungen zur Mikro-Elementaranalyse nach Pregl.

Von Franz Hernler.

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Innsbruck.)

(Eingelangt am 10. Mai 1929.)

I. Erfahrungen auf verschiedenen Gebieten der Mikroanalyse.

Im folgenden sollen einige Erfahrungen auf dem Gebiete der Mikro-Elementaranalyse mitgeteilt werden, wie sie sich bei der Ausführung der PREGL'schen Methode im Laufe der Jahre ergeben haben. Wenn sie auch keine grundlegenden Änderungen der so bewährten PREGL'schen Arbeitsvorschriften und Apparaturen enthalten, so sind sie vielleicht doch dem einen oder anderen Mikroanalytiker willkommen, dem Anfänger vielleicht sogar erwünscht und vielleicht auch geeignet mitzuhelfen, anfänglich öfters auftretende Schwierigkeiten leichter zu überwinden. Und nicht zuletzt sollen sie auch ein kleiner Beitrag zu dem von FLASCHENTRÄGER[1]) in so begrüßenswerter Weise angeregten Meinungs- und Gedankenaustausch über die Mikro-Elementaranalyse sein.

Das Wägen.

Hier ist wohl nach dem Erscheinen der in F. EMICH's Institut ausgeführten, grundlegenden Arbeit von SCHWARZ-BERGKAMPF[2]) nichts mehr zu sagen. Als günstigste Temperatur, gemessen im Waageninnern, hat sich für sehr genaue Wägungen eine solche etwa im Bereiche von 22 bis 24° C ergeben, bei der der Einfluß der Körperwärme des Wägenden während der Dauer einer Wägung kaum mehr von Einfluß ist. Sehr zweckmäßig ist bei jeder Wägung, einen gleichen Gegenstand als Tara zu benützen.

Die nach dem feucht-trockenen Abwischen von Glasgegenständen auftretende, scheinbare Gewichtsverminderung, die von M. SCHOORL[3]) „der Verdünnung der in denselben befindlichen Luft durch die unvermeidliche Erwärmung" zugeschrieben wird, sicher aber auch, und nicht zum kleinsten Teil, durch elektrosta-

[1]) FLASCHENTRÄGER, Zeitschr. f. angew. Chemie, 39, S. 717 (1926).

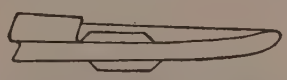
[2]) SCHWARZ-BERGKAMPF, Fr. 69, S. 321 (1926).

[3]) M. SCHOORL, Chem. Weekblad 16, 481 (1919); KLEIN-STREBINGER, Fortschritte d. Mikrochemie, Wien 1928, S. 301.

tische Ladungen[4]) verursacht wird — jedes Glasgefäß zeigt ja schon nach geringfügigem Berühren leicht nachweisbare elektrostatische Ladungen — kann, einer Anregung KARL BRUNNER's folgend, stark vermindert und ihre Dauer wesentlich gekürzt werden durch Einstellen eines radioaktiven Präparates in das Waageninnere, dessen Aktivität gar nicht besonders stark zu sein braucht, um die umgebende Luft genügend zu ionisieren. Dadurch wird eine kürzere, sich lediglich auf den notwendigen Temperaturausgleich erstreckende Wartezeit erreicht.

Zum Einwägen von festen Substanzen in ein Gefäß, insbesondere beim Mikro-Dumas in das Mischröhrchen, hat sich ein von K. BRUNNER angegebenes Wägeschiffchen aus Silber- oder aus Platinblech besser bewährt als die von PREGL angegebenen Wägeröhrchen (l. c. S. 105). Das Arbeiten mit ihm ist so einfach und sicher, seine Reinigung durch bloßes Abpinseln so rasch durchführbar und eine recht genaue Dosierung der Substanzmenge so leicht möglich, daß seine Form in untenstehender Skizze wiedergegeben sei.

Es kann aus einem entsprechend geschnittenen Silber- oder Platinblech leicht selbst gebogen werden; es besitzt eine Länge von etwa 60 mm, am rückwärtigen Ende eine Breite von 10 mm und verjüngt sich gegen die Spitze zu um etwa 3 mm. Die beiden Flügel dienen zum Anfassen mit der Pinzette und verhindern ein



zu tiefes Einschieben des Schiffchens in das Gefäß, während die hinteren Enden des seitlichen Randes so nach abwärts gebogen sind, daß dadurch ein sicherer Stand auf der Waagenschale gewährleistet ist. Den zu wägenden Körper bringt man auf den Teil zwischen Spitze und Flügel, führt die Spitze nach der Wägung in die Öffnung des Gefäßes, bringt durch leichtes Aufstoßen die Substanz in dasselbe und wägt das Schiffchen mit den noch anhaftenden Substanzteilchen zurück. Als Tara dient ein zweckmäßig zusammengebogenes Blech aus gleichem Material. Es ist selbstverständlich, daß hygroskopische Substanzen damit nicht gewogen werden können.

[4]) PREGL, Org. Mikroanalyse, 2. Aufl., 1923, S. 47.

Die Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmung.

Als Gasbehälter haben sich Glockengasometer, die einen annähernd konstanten Druck aufrechtzuerhalten gestatten, gegenüber anderen bestens bewährt. An den Enden der beiden Druckregler werden Glassplitter herausgebrochen, um kleineren Blasen den Austritt zu ermöglichen, da sonst durch das Herauswölben von großen Blasen jeweils ganz erhebliche Drucksteigerungen verursacht werden[5]). Der Blasenzähler hat zur besseren Verfolgung der Stromgeschwindigkeit eine etwas größere Blasenfrequenz als manche käuflichen, und sie liegt zweckmäßig für eine Stromgeschwindigkeit von 3 bis 5 cm^3/min. innerhalb der Grenzen von etwa 15 bis 25 Blasen in 10 Sekunden. Als Trockensystem werden zwei kleine, zusammengeschmolzene U-Röhrchen verwendet, von denen das eine mit Natronkalk, das andere nur mit Chlorkalzium gefüllt wird. Dadurch kann man durch Sperren der Hähne das Chlorkalzium vor der ständigen Berührung mit dem feuchten Natronkalk schützen und leichter eine Gleichwertigkeit des Kalziumchlorids im Trockenapparat und den Absorptionsröhrchen erreichen.

Der Gasstrom wird, ähnlich wie bei der Apparatur von Müller und Willenberg[6]), seitlich in das Verbrennungsrohr durch ein angeschmolzenes Glasröhrchen eingeführt, das seinerseits mit einem an das Trockensystem angeschmolzenen und rechtwinklig abgebogenen Kapillarrohr Glas an Glas durch ein paraffiniertes Schlauchstück verbunden ist. Dadurch erreicht man eine stabilere Anordnung der Apparatur und enthebt sich des jedesmaligen Verschiebens des Trockensystems beim Einbringen der Substanz in die Verbrennungsröhre. Als Verbrennungsröhren haben sich solche aus Jenaer Supremaxglas glänzend bewährt und da ihre Bearbeitung in der Sauerstoffgebläseflamme leicht möglich ist, wird der Schnabel bis zur gewünschten Stärke jeweils ausgezogen, da die angesetzten Schnäbel leicht wieder abbrechen. Als Rohrfüllung hat sich die Pregl'sche „Universalfüllung" bestens bewährt und wurde nur einmal durch Vorlegen von Feingolddraht in den Schnabel bei der Analyse von Quecksilberverbindungen zur vollständigen Zurückhaltung des Quecksilbers abgeändert. Das Bleisuperoxyd wird mit der „Massivgranate" erhitzt, deren Tempera-

[5]) Vergl. a. Meixner und Kröcker, diese Zeitschrift, Bd. V, S. 121 (1927).
[6]) J. f. prakt. Ch. 99, S. 34 (1919).

tur durch einen Cymoldampfdruckregulator konstant gehalten wird. Übrigens scheint es sehr zweckmäßig, bei der Verbrennung von stickstofffreien Körpern das Bleisuperoxyd, diesen wohl recht heiklen Körper, bei der Rohrfüllung zu vermeiden. Hinter das Schiffchen wird noch eine 10 bis 15 mm lange Platindrahtspirale gegeben, die ein Zurücksteigen unverbrannter Substanz verhindert.

Neue Absorptionsapparate werden nach FRIEDRICH[7]) ausgekocht. Bei ihrer Wägung werden als Tara ebenfalls gefüllte Absorptionsröhrchen verwendet, die gleich behandelt und während der Verbrennung mit Schlauchkappen verschlossen auf dem „Federgestell" liegengelassen werden[8]). Dadurch wird eine leichter erreichbare Gewichtskonstanz erzielt und man ist nicht so sehr an die genaue Einhaltung der Wartezeit gebunden, was sonst unbedingt notwendig erscheint[9]).

Die Stickstoffbestimmung nach Dumas.

Als Kohlensäureentwickler wird im allgemeinen ein nach PREGL hergerichteter Kippapparat benützt. Versuche mit dem von SCHOELLER[10]) angegebenen Apparat waren sehr zufriedenstellend und das erhaltene Gas ebenso wie das mit dem Bikarbonatröhrchen nach W. BRUNNER[11]) erhaltene noch etwas besser. Letzteres eignet sich immer dann, wenn nur selten Sticksoffbestimmungen auszuführen sind oder wenn einmal mit einem sonst tadellos arbeitenden Kippapparat keine brauchbaren Mikroblasen erhalten werden können, was zwar selten, aber immerhin manchmal eintritt. Die ständige Beaufsichtigung, die es allerdings erfordert, scheint durch die Einschaltung eines Dreiweghahnes von DIEPOLDER[12]) stark vermindert worden zu sein und ermöglicht damit ebenfalls die Durchführung der Verbrennung bei geschlossenem Hahn.

Eine seinerzeit versuchsweise Verlegung der reduzierten Kupferschicht in die Spitze des Verbrennungsrohres hat sich ungünstig auf die Analysenergebnisse ausgewirkt[13]). An Stelle des reduzier-

[7]) Ztsch. f. angew. Chem. 36, S. 481 (1923).
[8]) Vergl. a. SCHOELLER, Zeitschr. f. angew. Chem. 34, S. 582 (1921).
[9]) Vergl. MEIXNER und KRÖCKER, l. c. S. 124.
[10]) l. c. S. 586.
[11]) Dissertation, Freiburg i. Br. (1914); vergl. a. Chem. Ztg. 38, S. 767 (1914).
[12]) Chem. Ztg. 43, S. 353 (1923).
[13]) Vergl. dazu BÖCK und BEAUCOURT, diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 70 ff. (1928).

ten, drahtförmigen Kupfers wird eine mit Methylalkohol reduzierte Kupferspirale verwendet, die die bleibende Füllung in ihrer Lage festhält und den Asbestpfropf erübrigt[14]). Das drahtförmige Kupferoxyd und das daraus durch Zerreiben im Achatmörser selbst dargestellte feine Kupferoxyd für die „bewegliche Füllung" wird nach jedem Ausglühen sofort in einen kurzhalsigen Kjeldahlkolben geschüttet und dieser dreimal abwechselnd evakuiert und mit luftfreier Kohlensäure gefüllt und schließlich unter Kohlensäuredruck erkalten gelassen. Mit diesem Kupferoxyd wird auch im Blindversuch keine besonders merkliche Vergrößerung der Blasen und nach einer Verbrennung stets wieder Mikroblasen erhalten.

Recht angenehm wurde folgende Aufstellung des Azotometers empfunden: es wird mit Hilfe eines Glühringes mit Muffe fest mit seinem Fuß auf ein Plattenstativ gepreßt, das durch Aufstellen auf Glasröhren[15]) nach allen Richtungen hin leicht beweglich gemacht ist. Das Einstellen der Birne erfolgt durch Einhängen eines an ihrem Hals befestigten Hakens in die Glieder einer längs des Stativs eingespannten Kette, wie sie bei Zugjalousien verwendet werden.

Die Halogenbestimmung.

Die nach PREGL's Vorschriften durchgeführten Bestimmungen ließen nichts zu wünschen übrig. Seinerzeit angestellte Versuche, an Stelle der Asbestfilterröhrchen solche mit Glasfritten der Firma SCHOTT und GEN. zu verwenden, waren wenig befriedigend, da die automatische Überführung des Niederschlages durch das Auftreten eines gleichen Oberflächenspannungsphänomens, wie es WINTERSTEINER[16]) für den Mikro-Neubauertiegel beschreibt, sehr erschwert wurde. Nach Erscheinen dieser Arbeit wurde durch Anwendung einer ähnlichen Filtriervorrichtung, die auf eine konische Erweiterung der Glasröhre, in der das Filterröhrchen steckt, mit einer Gummimanschette aufgesetzt wurde, die automatische Überführung des Niederschlages anstandslos durchgeführt und die erhaltenen Resultate waren recht befriedigend.

---

[14]) Vergl. FLASCHENTRÄGER, l. c. S. 718.
[15]) SCHOELLER, l. c. S. 586.
[16]) WINTERSTEINER, diese Zeitschrift, Bd. II, S. 16 (1924).

Handelt es sich um die Bestimmung ionisierbar gebundenen Halogens, so eignen sich dazu die von SCHWARZ-BERGKAMPF[17]) beschriebenen Filterbecher ausgezeichnet. Das angenehme und sichere Arbeiten mit ihnen ließ den Versuch naheliegend erscheinen, sie in etwas vergrößertem Maßstabe auch auf die Bestimmung organisch gebundenen Halogens anzuwenden.

Die von der Firma SCHOTT und GEN. gelieferten Filterbecher hatten einen Durchmesser von 35 mm, bei einer Höhe von 54 mm. Die Achse des Ansatzstutzens hatte eine solche Neigung, daß ihre Verlängerung die gegenüberliegende Bodenkante traf. Der Fassungsraum bis zum Ansatz mit der Filterschicht betrug etwa 33 cm^3. Da zum dreimaligen Ausspülen des Perlenrohrs nie mehr als 20 bis 25 cm^3 Flüssigkeit benötigt wurden, schien eine Verwendung dieser Becher unter der Voraussetzung möglich, daß so große Glasgefäße mit einem Gewicht von etwa 18 g noch die nötige Gewichtskonstanz zeigen. Nachstehende Zahlen beweisen die Brauchbarkeit dieser großen Becher, die den großen Vorteil bieten, einen Verlust an Niederschlag fast unmöglich zu machen. Gewogen wurde unter den eingangs erwähnten Vorsichtsmaßregeln bei einer konstanten Temperatur von 23 bis 24° C. Als Tara diente ein gleicher Filterbecher, der vor der Wägung ebenfalls feucht-trocken abgewischt wurde. Die Empfindlichkeit der Kuhlmann-Waage zeigte trotz der großen Belastung nur eine geringfügige Änderung, die berücksichtigt wurde. Die Becher waren „nach einer etwa halbstündigen Wartezeit gewichtskonstant. Der Trockenkasten von SCHWARZ-BERGKAMPF war entsprechend größer dimensioniert und seine Temperatur wurde einfachheitshalber mit einem Regulator auf 122° C eingestellt. Die Sodalösung wurde in einer Jenaer Proberöhre mit 2 bis 3 Tropfen Bisulfitlösung gemischt, im Perlenrohr aufgesaugt, nach dem Abtropfen und Ausblasen die Spitze des Rohres reingewischt und zum Schutz gegen Staub mit dem gewogenen Filterbecher bedeckt. Die Sodalösung wurde für folgende Bestimmungen wieder verwendet. Die weiteren Arbeiten wurden gemäß dem PREGL'schen Vorschriften durchgeführt.

Die Gewichtskonstanz der Filterbecher beim Blindversuch schwankte zwischen — 0,021 und + 0,003 mg.

Die zunächst durchgeführten Cl-Bestimmungen in reinem Kochsalz ergaben folgende Werte:

[17]) SCHWARZ-BERGKAMPF, Fr. 69, S. 336.

Einwage NaCl in mg	Gef. AgCl in mg	Gef. % Cl	Ber. % Cl	△%
4,586	11,274	60,82	60,66	+ 0,16
3,438	8,464	60,90	60,66	+ 0,24
3,922	9,596	60,53	60,66	— 0,13
2,845	6,969	60,60	60,66	— 0,06
6,734	16,569	60,87	60,66	+ 0,21
5,232	12,811	60,57	60,66	— 0,09

In nachfolgender Tabelle (S. 147) ist eine Reihe von Beleganalysen zusammengestellt. Wie die Zahlen zeigen, können die großen Filterbecher sehr gut zur Bestimmung der Halogene verwendet werden und bieten dabei folgende Vorteile: Fast sichere Gewähr, daß kein Niederschlag verloren werden kann. Das oft mühsame Entfernen von festhaftendem Niederschlag aus der Fällungsproberöhre mit dem Federchen entfällt. Kürzung der Arbeitszeit durch die geringe Menge von Waschflüssigkeit. Vielleicht bestehende leichte Durchführbarkeit einer Trennung von Halogen und Schwefel, bei Fällung des letzteren mit salpetersaurer Bariumnitratlösung. Nicht zuletzt das einfache und angenehme Arbeiten mit den Filterbechern.

Die Schwefelbestimmung.

Die Verbrennung wurde nach der von PREGL gegebenen Vorschrift, die Überführung des Bariumsulfates in den Mikrotiegel mit Hilfe der von WINTERSTEINER[18]) angegebenen Filtriervorrichtung ausgeführt. Versuche mit den Mikro-Porzellanfiltertiegeln von der Berliner Porzellanmanufaktur haben sich sehr gut bewährt. Da in der Literatur nur wenige diesbezügliche Zahlen zu finden sind[19]), sei kurz folgendes darüber gesagt: Die Gewichtskonstanz bei einer Reihe von Blindversuchen schwankte zwischen — 0,011 und + 0,003 mg. Da sie auch kalt gefälltes Bariumsulfat vollständig zurückhalten, bieten sie einen recht vollwertigen Ersatz für den immerhin kostspieligen Mikro-Neubauertiegel.

3,562 mg $BaCl_2 \cdot 2H_2O$: 3,399 mg $BaSO_4$ = 56,15% Ba gef.: ber. 56,23% Ba. △ = — 0,08%.

[18]) WINTERSTEINER, diese Zeitschrift, Bd. II, S. 15 (1924).

[19]) FLASCHENTRÄGER, l. c. S. 721; MEIXNER und KRÖCKER, l. c. S. 128.

Substanz	Einwage in mg	Gef. Hal. Ag in mg	Gef. %	Ber. %	△%
$C_6H_5 . (CH_3)_2 . C_2N_3 . HCl$ [1]	4.557	3.121 AgCl	16.94	16.92	+ 0.02
$o\text{-}CH_3 . C_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HCl$ [2]	5.111	3.268 AgCl	15.82	15.86	— 0.04
$m\text{-}CH_3 . C_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HCl$ [2]	4.963	3.164 AgCl	15.77	15.86	— 0.09
$p\text{-}CH_3 . C_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HCl$ [2]	4.776	3.079 AgCl	15.95	15.86	+ 0.09
$p\text{-}BrC_6H_4 . (CH_3)_2 . C_2N_3$ [3]	3.936	2.927 AgBr	31.65	31.71	— 0.06
$p\text{-}BrC_6H_4 . (CH_3)_2 . C_2N_3$ [3]	4.112	3.071 AgBr	31.78	31.71	+ 0.07
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . C_6H_3N_3O_7$ [4]	4.202	1.628 AgBr	16.48	16.61	— 0.13
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . C_6H_3N_3O_7$ [4]	6.111	2.354 AgBr	16.39	16.61	— 0.22
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HCl$ [5]	3.868	4.417 AgCl + AgBr	39.79	39.99	— 0.20
$p\text{-}BrC_6H_4 CH_3)_2 . C_2N_3 . HCl$ [5]	4.633	5.292 AgCl + AgBr	39.80	39.99	— 0.19
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HCl$ [5])*)	4.881	2.403 AgCl	12.18	12.29	— 0.11
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HCl$ [5])*)	2.973	1.484 AgCl	12.35	12.29	+ 0.06
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HJ$ [6])	4.375	4.857 AgBr + AgJ	54.34	54.44	— 0.10
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HJ$ [6])	5.114	5.697 AgBr + AgJ	54.52	54.44	+ 0.08
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HJ$ [6])*)	4.385	2.696 AgJ	33.23	33.40	— 0.17
$p\text{-}BrC_6H_4(CH_3)_2 . C_2N_3 . HJ$ [6])*)	2.996	1.853 AgJ	33.43	33.40	+ 0.03

[1]) Phenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-hydrochlorid. [2]) o-, m- u. p-Tolyl-1-dimethyl-3, 5 triazol-1, 2, 4-hydrochloryd. [3]) p-Bromphenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4. [4]) p-Bromphenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-pikrat. [5]) p-Bromphenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-hydrochlorid. [6]) p-Bromphenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-hydrojodid.

*) Wurden in den kleinen Filterbechern von Schwarz-Bergkampf durch Ausfällen der salpetersauren Lösung bestimmt.

4,579 mg $BaCl_2 \cdot 2H_2O$: 4,365 mg $BaSO_4$ = 56,09% Ba gef.;
ber. 56,23% Ba. Δ = — 0,14%.
5,611 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 5,335 mg $BaSO_4$ = 13,06% S gef.;
ber. 12,84% S Δ = + 0,22%.
6,002 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 5,672 mg $BaSO_4$ = 12,98% S gef.;
ber. 12,84% S Δ = + 0,14%.
5,111 mg Sulfonal : 10,498 mg $BaSO_4$ = 28,21% S gef.;
ber. 28,10% S Δ = + 0,11%.
4,997 mg Sulfonal : 10,304 mg $BaSO_4$ = 28,33% S gef.;
ber. 28,10% S Δ = + 0,22%.
4,779 mg Cystin : 9,266 mg $BaSO_4$ = 26,63% S gef.;
ber. 26,48% S Δ = + 0,15%.
5,342 mg Cystin : 10,264 mg $BaSO_4$ = 26,39% S gef.;
ber. 26,48% S. Δ = — 0,09%.

Zur Sublimation unter vermindertem Druck hat sich der kleine Apparat von R. Eder[20]), der zweckmäßig in einem Metallbad erhitzt wird, sehr gut bewährt.

Zum Schlusse sei noch erwähnt, daß ich die Mikro-Elementaranalyse lediglich nach Pregl's Buch erlernt habe, dessen Anleitungen in jeder Hinsicht als ausreichend und vollständig genügend empfunden wurden.

II. Über eine temperaturkonstante Granate zur C-H-Bestimmung.

Wie Pregl in seinem Buch „Die quantitative organische Mikroanalyse" (Verl. J. Springer, Berlin, 2. Aufl., 1923), S. 33ff. eingehend erörtert, ist das Bleisuperoxyd bei der Mikroelementaranalyse stickstoffhaltiger Verbindungen nicht zu entbehren[1]). „trotzdem es mehrfach Aufmerksamkeit in seiner Behandlung und Anwendung erfordert". Einer seiner Mängel ist das Festhalten von Feuchtigkeit[2]) und es ist daher, „um korrekte Wasserstoffwerte zu erhalten, notwendig, das Bleisuperoxyd nicht nur während der Verbrennung, sondern auch schon früher während des Ausglühens des Rohres, auf konstanter Temperatur zu erhalten". Dies

[20]) Houben, Methoden der org. Ch., 2. Aufl. Bd. I., S. 698 (Leipzig 1925).

[1]) Vergl. a. J. Lindner, Verfahren zur maßanalytischen Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes in der Elementaranalyse, Fr. 66, S. 334 (1925), und Fehlerquellen in der organischen Elementaranalyse I: Das Bleisuperoxyd, B. 59, S. 2561 (1926).

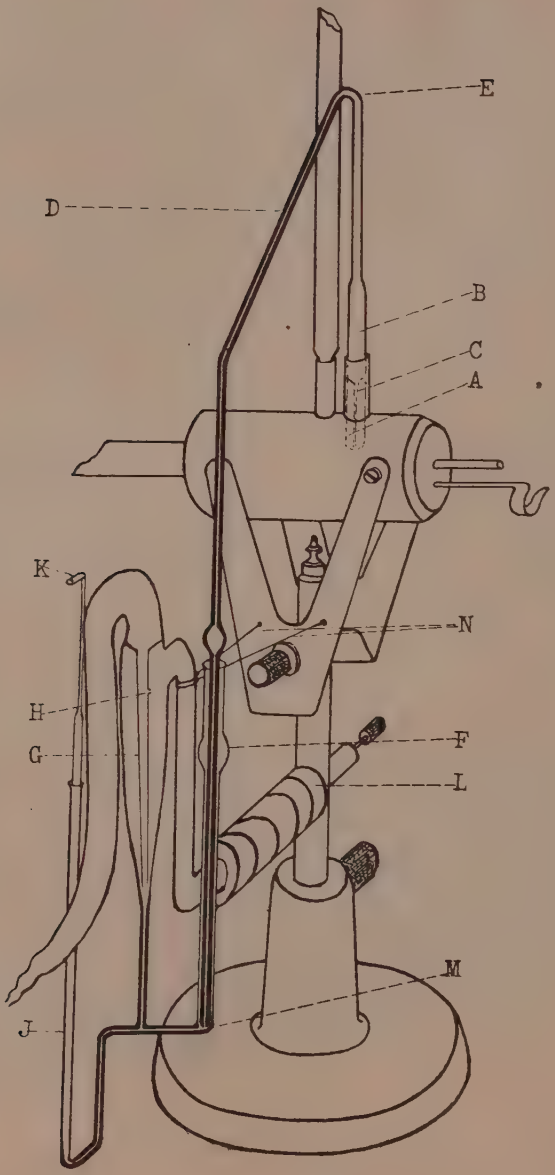
[2]) Pregl, l. c. S. 37.

erreichte PREGL zunächst mit seiner „Massivgranate" aus Kupfer, später durch die „Hohlgranate", bei der die konstante Temperatur durch eine in ihr kochende Flüssigkeit aufrechterhalten wird. Die am hiesigen Institut mit letzterer gemachten Erfahrungen waren insofern nicht die günstigsten, da des öfteren Undichtigkeiten, insbesondere an der Einkittstelle des Steigrohrs, dann auch Überhitzungen des Bleisuperoxydes eintraten, die dadurch verursacht wurden, daß die geringe Menge der Siedeflüssigkeit in das Steigrohr hinaufkochte. Daher wurde schon vor Jahren wieder zur Massivgranate zurückgekehrt, die die Einhaltung einer konstanten Temperatur — einen gleichmäßigen Gasdruck vorausgesetzt — recht gut gestattet, besonders wenn man die Flamme des Mikrobrenners mit einem kleinen Schornstein gegen Luftzug und mit einer kleinen Asbestplatte gegen Wärmestrahlung durch den Langbrenner schützt; auch PREGL berichtet (1. c. S. 38), daß er in neuerer Zeit, wenn auch aus anderen Gründen, wieder erfolgreiche Versuche mit einer Massivgranate aus Aluminium angestellt hat[3]). Immerhin erfordert sie ständige Beaufsichtigung, und es kann bei schwankendem Gasdruck z. B. während dem Wägen der Absorptionsapparate leicht zu Temperaturschwankungen bis zu 20° C und mehr kommen.

LINDNER erreicht bei seiner Analysenmethode (1. c. S. 347) die konstante Temperatur mit Hilfe eines Dampfdruckregulators, und es war der Versuch naheliegend, auch für die PREGL'sche Methode die Granate mit einem ähnlichen Regulator auszustatten. Die mit ihm gemachten, jahrelangen Erfahrungen hinsichtlich Temperaturkonstanz sind so befriedigend, daß seine Einrichtung und Herstellung hier kurz geschildert werden soll. Wenn auch bei einer betriebsmäßigen Herstellung sicherlich Änderungen und Verbesserungen angebracht werden können, so sei er hier doch so beschrieben, wie er bei einiger Übung im Glasblasen an jeder Massivgranate leicht selbst angebracht werden kann.

Zu diesem Zweck bohrt man in die Massivgranate (vergl. umstehende Figur) neben der Hülse, die zur Aufnahme des Thermometers dient, ein etwa 8 mm weites Loch bis knapp an die Durchbohrung der Granate, setzt ein dünnwandiges Messingrohr ein und fixiert es mit drei Nutschlägen mit dem Spitzmeißel. In diese Öffnung kommt der kleine Behälter, der zur Aufnahme einer geringen Cymolmenge

[3]) Vergl. a.: DIEPOLDER, Chem. Ztg. 43, S. 354 (1923); MEIXNER und KRÖCKER, diese Zeitschrift, Bd. V, S. 121 (1927). Über eine dadurch mögliche Fehlerquelle s. a. BÖCK und BEAUCOURT, diese Zeitschrift, Bd. VI, S. 139 (1928).



(½ natürl. Größe.)

und des Quecksilbers dient. Er besteht aus zwei Gefäßen, von denen das obere (B) mit dem unteren (A), das etwa eine Höhe von 7 mm besitzt, durch eine Kapillare (C), die bis knapp an seinen Boden reicht, in Verbindung steht. Er wird aus einer dünnen Glasröhre geblasen, die eben in die Öffnung der Messingröhre hineinpaßt. Das obere Gefäß (B) verjüngt sich in einer Höhe von ungefähr 35 mm zu einer Röhre von 5 mm äußeren Durchmesser und hat eine solche Länge, daß sie, das Gefäß in die Granate eingesetzt, etwa 10 cm über ihren oberen Rand emporragt. Daran schmilzt man eine zweimal gebogene Kapillare (D) von ungefähr 4 mm äußeren Durchmesser, die in ihrem absteigenden Teil zu einer kleinen Kugel erweitert ist. Bevor man das Quecksilbergefäß mit der Kapillare zusammenschmilzt, schreitet man aber zu seiner Füllung.

Zunächst bringt man unter Zuhilfenahme der Saugpumpe einen kleinen Tropfen Cymol in das untere Gefäß (A) und bringt ihn durch Umdrehen des Röhrchens und Klopfen an die Ansatzstelle der Kapillare (C). Nun füllt man in das obere Gefäß (B) eine entsprechende Menge trockenen Quecksilbers, evakuiert möglichst stark und läßt durch Aufheben des Vakuums das Quecksilber in das untere Gefäß (A) eintreten. Ist dieses auf diese Weise fast vollständig mit Quecksilber gefüllt, so saugt man durch nochmaliges, starkes Evakuieren den größten Teil des Quecksilbers in das obere Gefäß (B) und bringt durch vorsichtiges Erwärmen über ganz kleiner Flamme das im unteren Gefäß (A) verbleibende Quecksilber zum Verdampfen, ohne dabei das Cymol zu stark zu erhitzen, wobei man dem Röhrchen eine solche Neigung gibt, daß die Luft durch die Kapillare (C) entweichen kann. Durch Senkrechtstellen und Aufheben des Vakuums füllt sich nun das untere Gefäß (A) vollständig mit Quecksilber, während auf ihm noch eine genügende Menge Cymol verbleibt. Im oberen Gefäß (B) beläßt man Quecksilber in einer Höhe von 3 bis 5 mm.

Die Anordnung und Darstellung des eigentlichen Regulatorgefäßes geht aus der Abbildung hervor. (Vergl. a. d. Abbdg. b. LINDNER, l. c. S. 347.) Bei seiner Herstellung sind folgende Punkte zu berücksichtigen: Das aufsteigende Glasrohr (F) ist in seiner lichten Weite so zu wählen, daß es durch die Kapillare (D) gut ausgefüllt wird. Die Spitze des dünnen Einleitungsröhrchens (G) im Regulatorgefäß ist entgegen den Angaben C. DRUCKER's[4]) abzuschrägen, da bei vollkommen eben abgeschnittenen Zuleitungsröhrchen durch Haftenbleiben der Quecksilberoberfläche und zu spätem Abreißen der sich bildenden Quecksilberkuppe unzulässige Temperaturschwankungen bedingt werden. Außerdem ist seine Spitze zur Erreichung einer großen Temperaturempfindlichkeit möglichst weit in das sich verjüngende, äußere Rohr einzuführen und es gelingt sogar bei recht genauer Dimensionierung dieser Stelle auch ohne Cymol, lediglich durch die Ausdehnung des Quecksilbers, einen recht brauchbaren Regulator darzustellen. Immerhin soll man auf die Anwendung des Cymols nicht verzichten, wird doch dadurch eine unüberschreitbare Temperaturgrenze gewährleistet. Die kleine Öffnung (H) für die Sparflamme in der Zuleitungsröhre ist so zu wählen, daß die mit ihr erhaltene Flamme genügt, um die Temperatur der Granate auf etwa 150 bis 160° C zu bringen und wird zweckmäßig vor dem Zusammenblasen des Regulators ausprobiert. Das zweite aufsteigende Glasröhrchen (J) am Regulatorgefäß, das etwa

[4]) OSTWALD-LUTHER, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physikochemischer Messungen, 4. neubearb. Aufl., S. 116 (1925).

eine lichte Weite von 3 bis 4 mm hat, dient als Niveaurohr und gestattet ein einfaches Dosieren der Quecksilbermenge im Regulatorgefäß. In seine Öffnung paßt ein Glasstäbchen (K), das sich durch schwaches Drehen infolge der nicht genau kreisrunden Querschnitte in jeder Lage darin fixieren läßt und mit dem man das Quecksilber im Regulator bis zur gewünschten Höhe empordrücken und festhalten kann.

Hat man das Regulatorgefäß an der Gaszuleitungsröhre (L) der Granate mit einem dickwandigen Gummischlauch befestigt und mit Drahtligaturen gesichert, so setzt man die Kapillare (D) in die Röhre (F) ein, schneidet sie an der Stelle (E) ab, an der sie mit dem in die Granate eingesetzten Quecksilberröhrchen zusammenstößt, schmilzt beide zusammen und biegt es an der Lötstelle so, daß sich die Kapillare in das Regulatorgefäß und der Quecksilberbehälter in die Messingröhre ohne Spannung einführen läßt. Für ein sicheres Arbeiten ist es unerläßlich, daß die Spitze der Kapillare in der Biegung (M) des Regulators aufsteht. Dies erreicht man am einfachsten dadurch, daß man bei dem so montierten Apparat die eine oder die andere Biegung der Überleitungsröhre (D) mit der Gebläseflamme bis zum Weichwerden erhitzt und bis zum Aufsitzen in der Biegung niederdrückt. Um jede Verschiebung und dadurch bedingte Temperaturschwankung zu vermeiden, kann man noch den Regulator, wie aus der Abbildung ersichtlich, mit einem dünnen Aluminiumdraht (N) am Granatengestell befestigen.

Nun füllt man durch das Niveaurohr (J) Quecksilber in den Regulator und entzündet die Flamme des Mikrobrenners. Ist der Siedepunkt des Cymols erreicht, so drückt dieses beim Verdampfen das Quecksilber in das obere Gefäß (B) und dieses durch Luftverdrängung das Quecksilber im Regulatorgefäß, das man mit Hilfe des Glasstäbchens (K) im Niveaurohr (J) bis knapp unter die Öffnung der Einleitungskapillare (G) eingestellt hat, nach oben, verschließt die Gaszuleitungsöffnung und verhindert jede weitere Temperatursteigerung.

Beim Erkalten der Granate wird Quecksilber in die Kapillare (D) aufgesaugt und es kann daher erst beim zweiten Erhitzen die endgültige Einstellung des Quecksilbers im Regulator vorgenommen werden.

Da der Siedepunkt des Cymols bei 175° C liegt, so hat man es in der Hand, durch Änderung der Quecksilbermenge, entweder in der absteigenden Kapillare (D) oder im oberen Gefäß (B), durch die dadurch bewirkte Druckänderung die Temperatur der Granate im Bereiche von etwa 170 bis 190° C festzulegen. Bei gut arbeitendem Regulator beträgt die größte Temperaturschwankung $\pm$ 2° C, für den vorliegenden Zweck sicherlich genügend konstant, wobei seine Abhängigkeit vom Luftdruck belanglos ist.

Nach sehr langem Gebrauch wird der Regulator allmählich infolge immerhin verdampfenden Cymols weniger wirksam und es ist dann eine Neufüllung des Quecksilbergefäßes notwendig. Nach Entfernen der Drahtbefestigung (N) wird die Kapillare (D) aus dem Regulatorgefäß gehoben, an der Biegung (E) abgeschnitten und nach dem Entleeren, Reinigen und Neufüllen des Quecksilber-

gefäßes die Apparatur in der oben beschriebenen Weise wieder zusammengesetzt.

Dadurch, daß der Regulator auf der dem Experimentator abgewendeten Seite der Apparatur montiert ist, ist die Bruchgefahr sehr gering und die Angst davor jedenfalls verschwindend gegenüber dem Sicherheitsgefühl, daß die Temperatur des Bleisuperoxydes, sei es nun während dem Wägen der Absorptionsapparate oder dem oft länger dauernden Ausglühen der Verbrennungsröhre, sicher und dauernd die gewünschte bleibt. Vielleicht kann dieser kleine und recht brauchbare Apparat auch anderwärts gute Dienste leisten.

Beitrag zur Mikroanalyse organischer Quecksilberverbindungen.

Gleichzeitige Bestimmung von Stickstoff und Quecksilber.

Von **Franz Hernler.**

(Aus dem Chemischen Institut der Universität Innsbruck.)

(Eingelangt im 26. April 1929.)

Vor längerer Zeit schon wurden beim Arbeiten über 1-, 2-, 4-Triazole eine Reihe von Quecksilberchloriddoppelsalzen erhalten, deren vollständige Analyse wünschenswert schien. Da in diesem Falle bei der mikroanalytischen C-H-Bestimmung nach PREGL die Wasserstoffwerte ganz entgegen den sonst gewohnten, glänzenden Erfahrungen, wenn auch meist noch innerhalb der Fehlergrenze liegend, doch stets zu hoch gefunden wurden, wurde zur Bindung des anscheinend spurenweise übergehenden Quecksilbers die PREGL'sche „Universalfüllung" insoferne etwas abgeändert, als in die Spitze des Verbrennungsrohres zunächst ein Bäuschchen von Feingolddraht so eingefüllt wurde, daß das eine Ende des Golddrahtes ungefähr einen Zentimeter in die Kapillare des Schnabels hineinragte. Auf dieses Goldbäuschchen folgt dann die normale Rohrfüllung nach PREGL. Die mit dem so gefüllten Rohr erhaltenen Wasserstoffwerte schwankten um den theoretischen Wert und waren zufriedenstellender, wie die nachfolgende Zusammenstellung von Mittelwerten aus mehreren Analysen zeigt. Daß tatsächlich spurenweise Quecksilber in den Schnabel des Verbrennungsrohres gelangt — weitaus der größte Teil wird im Bleisuperoxyasbest und dem beiderseits anschließenden Tressensilber zurückgehalten — konnte nach einer größeren Anzahl von Analysen dadurch beobachtet werden, daß der in den Schnabel des Verbrennungsrohres hineinragende Golddraht stellenweise eine graue Färbung angenommen hatte, die beim schwachen Erhitzen unter Durchleiten von Luft verschwand, wobei mit der Lupe der Beschlag des abdestillierenden Quecksilbers deutlich verfolgt werden konnte.

In einer vor einiger Zeit in dieser Zeitschrift (Bd. VI, S. 5 [1928]) erschienenen Abhandlung „Eine mikroanalytische Bestimmung des Quecksilbers in organischen Substanzen und über die C-H-Bestimmung in solchen" zeigt A. VERDINO, daß die PREGL-

Substanz	% H ber.	% H ohne Goldvorlage	△% H	% H mit Goldvorlage	△% H
$C_6H_5(CH_3)_2C_2N_3 \cdot HgCl_2$ [1])	2,49	2,68	+ 0,19	2,38	— 0,11
m-$CH_3 \cdot C_6H_4(CH_3)_2C_2N_3 \cdot HgCl_2$ [2])	2,86	3,13	+ 0,27	2,77	— 0,09
m-$CH_3 \cdot C_6H_4(CH_3)_2C_2N_3 \cdot HCl \cdot HgCl_2$ [3])	2,85	3,14	+ 0,29	2,67	— 0,18
m-$CH_3 \cdot C_6H_4(CH_3)_2C_2N_3 \cdot HgCl_2$ [2])	2,86	3,27	+ 0,31	3,11	+ 0,25
p-$[CH_3 \cdot C_6H_4(CH_3)_2C_2N_3]_4 \cdot 3HgCl_2$ [4])	3,35	3,59	+ 0,24	3,26	— 0,09
p-$CH_3 \cdot C_6H_4(CH_3)_2C_2N_3 \cdot HgCl_2$ [5])	2,86	3,19	+ 0,33	3,10	+ 0,24

[1]) Phenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid. [2]) m-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid. [3]) Salzsaures m-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid. [4]) p-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchloriddoppelsalz. [5]) p-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid.

sche „Universalfüllung" bei der Analyse Hg-haltiger Verbindungen ausreichend ist und das Quecksilber vollkommen zurückgehalten wird. Die Wasserstoffwerte der fünf angeführten Beleganalysen lassen auch nichts zu wünschen übrig, beträgt doch die größte Differenz nur + 0,19% H. Worin die Verschiedenheit der Befunde liegt, kann allerdings nicht ohne weiteres gesagt werden, könnte sich aber vielleicht durch eine etwas höhere Temperatur der Granate (sie betrug bei meinen Versuchen 186° ± 2° C) oder durch eine verschiedene Länge des Schnabels der Verbrennungsröhre erklären lassen.

Das Quecksilber selbst wurde seinerzeit bei diesen Verbindungen nach dem von A. Meixner und F. Kröcker in dieser Zeitschrift, Bd. V (1927), S. 132, angegebenen Verfahren bestimmt, das auf der Verbrennung der organischen Substanz mit Kalziumoxyd und Auffangen des abgeschiedenen, elementaren Quecksilbers in einem mit Gold gefüllten Röhrchen beruht und im wesentlichen eine im Mikromaßstab ausgeführte, ursprünglich von Erdmann und Marchand[1]) angegebene Methode darstellt. Die damit erhaltenen Analysenresultate waren recht zufriedenstellend und ihre Genauigkeit lag etwa innerhalb einem halben Prozent.

[1]) Erdmann und Marchand, Journ. f. prakt. Ch. 31 (1844), S. 385; vergl. auch W. D. Treadwell, Analyt. Chemie (9., verm. u. verb. Aufl. 1921), Bd. II, S. 142.

Bei den Dumas-N-Bestimmungen nach PREGL, die, wie vorauszusehen war, ohne jede Änderung die gewohnt guten Werte ergaben, wurde beobachtet, daß sich knapp hinter der längeren Drahtnetzrolle im Verbrennungsrohr ein Quecksilberbeschlag absetzte, und es war der Gedanke naheliegend, beide Bestimmungsmethoden zu vereinigen und nach beendeter N-Bestimmung das abgeschiedene Quecksilber in das Goldröhrchen überzutreiben.

Wenn auch bei der Mikroanalyse wegen dem geringen Material- und Zeitaufwand, den sie meist nur erfordert, eine Zusammenfassung der Bestimmung mehrerer Bestandteile in eine Operation nicht mehr so wünschenswert erscheint wie früher, so dürfte sie doch überall dort am Platze sein, wo dies ohne Komplikation der Apparatur und wesentliche Erschwerung der auszuführenden Arbeiten durchführbar ist. Im gegebenen Fall schien dieser Versuch auch deshalb lohnend, da ja häufig Stickstoff in organischen Quecksilberverbindungen angetroffen wird.

Da durch Verwendung des aus Kalziumkarbonat und Salzsäure entwickelten Kohlensäurestromes, der stets stark salzsäurehaltig ist, die Bildung flüchtiger Kupferverbindungen zu befürchten war, die ihrerseits wieder die Resultate der Quecksilberbestimmungen fehlerhaft beeinflussen mußten, wurde die Kohlensäure in dem von A. SCHOELLER[2]) angegebenen Apparat aus im Vakuum geschmolzenem Kalium-Natriumkarbonat, bezogen von der Firma KAHLBAUM, und verdünnter Schwefelsäure dargestellt. Die Erfahrungen mit diesem Kohlensäureentwicklungsapparat waren sehr befriedigend und schon nach kurzer Zeit ließen die erhaltenen Mikroblasen nichts zu wünschen übrig und waren noch wesentlich kleiner als die auf gewöhnliche Weise erzeugten.

Um während der Bestimmung des Stickstoffes Verluste an Quecksilber zu vermeiden, wurden die Versuche zunächst mit einem sonst normal gefülltem Verbrennungsrohr ausgeführt, in dessen Schnabel aber etwas Feingolddraht gegeben wurde. Doch zeigte es sich dabei, daß das quantitative Abtreiben des Quecksilbers aus dem Gold erst bei höherer Temperatur und auch dann nur schwer durchführbar ist, wodurch die gefundenen Quecksilberwerte stets viel zu tief ausfielen. Dem konnte durch Weglassen des Goldes und Kühlung des etwas weiter über das Verbrennungsgestell hinausragenden Schnabels mit feuchten Flanellappen abgeholfen werden.

[2]) A. SCHOELLER, Ztschr. angew. Chem. 34, 586 (1921).

Als Verbrennungsrohr wurde ein 480 mm langes Jenaer Supremaxrohr von 10 mm äußerem Durchmesser verwendet, dessen eines Ende vor dem Sauerstoffgebläse zu einer dickwandigen, 14 mm langen und 3 mm im äußeren Durchmesser weiten Spitze ausgezogen wurde. Zur Füllung wurde drahtförmiges Kupferoxyd von MERCK verwendet, das vorher zur Entfernung von flüchtigen Verbindungen im Muffelofen bis zur Weißglut erhitzt wurde. Als reduzierte Kupferschicht wurde eine mit Methylalkohol reduzierte Spirale aus feinem Kupferdrahtnetz verwendet, die ein sicheres Festsitzen der „bleibenden Füllung" im Rohre gewährleistet und den Asbestpfropf überflüssig macht. Das gebrauchte, drahtförmige und feine Kupferoxyd wurde nach dem Ausglühen in einem Kjeldahlkolben mit kurzem Hals unter wiederholtem Evakuieren in reiner Kohlensäure erkalten gelassen, wodurch auch im Blindversuch beim Durchheizen der Röhre keine Vergrößerung der Mikroblasen erreicht wurde. Die 80 mm über das Verbrennungsgestell hinausragende Spitze wurde während der Verbrennung durch eine aufgesetzte Asbestplatte vor Wärmestrahlung geschützt, während das zur Analyse fertigbeschickte Rohr mit seinem leeren Ende 120 mm über das 280 mm lange Verbrennungsgestell hinausragte.

Das Goldröhrchen war dünnwandig und bestand ebenfalls aus Supremaxglas, hatte eine Länge von 45 mm, einen äußeren Durchmesser von 10 mm und war an seinem einen Ende etwas aufgetrieben, während das andere Ende zu einem kapillaren Schnabel von 35 mm Länge und 3 mm äußerem Durchmesser ausgezogen war. Die Füllung bestand aus einer 15 mm langen Schicht fest zusammengepreßten, dünnen Feingolddrahtes, wobei das eine Drahtende bis knapp an das Ende des Schnabels reichte, um sicher alles Quecksilber zu binden.

Da es bei der Ausführung der N-Bestimmung bei geschlossenem Hahn des Kippapparats leicht zum Zurückdestillieren des Quecksilbers kam, wurde auch versucht, die Bestimmung bei einem schwachen Kohlensäurestrom durchzuführen, wobei gute Analysenwerte gefunden wurden und selbst bei einer durchschnittlichen Stromgeschwindigkeit von etwa 2 bis 3 Blasen in der Sekunde (!) konnten beim Verbrennen von Acetanilid N-Werte von höchstens + 0,15% N erhalten werden. Im weiteren Verlaufe der Untersuchung zeigte es sich aber, daß die gefundenen Werte für Quecksilber gleich gut ausfielen, ob man nun die Verbrennung bei einem konstanten Kohlensäurestrom von etwa einer Blase in 3 bis

4 Sekunden oder bei geschlossenem Hahn des Kohlensäureentwicklungsapparats durchführt.

Die N-Bestimmung wird in bekannter Weise ausgeführt, nur wird die Spitze und eventuell auch das Ende der Verbrennungsröhre mit einem nassen Flanellappen gekühlt und durch eine aufgesetzte Asbestplatte vor Wärmestrahlung geschützt.

Erscheinen nach beendeter Verbrennung im Azotometer wieder Mikroblasen, so stellt man mit Hilfe des ebenfalls gerillten Hahnes des Kohlensäureentwicklungsapparats eine Stromgeschwindigkeit von ungefähr zwei Blasen in der Sekunde ein, schaltet das Azotometer ab, gibt nach Entfernung der Flanellappen und Asbestplatten und Abwischen der Spitze mit einem reinen Tuch auf den Schnabel eine kurze Drahtnetzrolle und schiebt das in eine Stativklemme eingespannte, mit der MARIOTTE'schen Flasche verbundene und genau gewogene Goldröhrchen auf den Schnabel des Verbrennungsrohres, kühlt das Ende der Goldfüllung mit einem nassen Flanellstreifen und saugt einen ungefähr doppelt so starken Luft- als Kohlensäurestrom mit der MARIOTTE'schen Flasche an. Nun treibt man zunächst mit kleingestellter Bunsenflamme eventuell zurückdestilliertes Quecksilber bis zum Langbrenner vor, wobei man einen manchmal auftretenden, schwer flüchtigen Beschlag unberücksichtigt läßt. Dann saugt man noch etwas stärker mit der MARIOTTE'schen Flasche und beginnt mit kleingestellter Bunsenflamme durch langsames Vorrücken der Drahtnetzrolle das Quecksilber in das Goldröhrchen überzutreiben. Ist man mit dem Brenner bis knapp an dasselbe herangekommen, so stellt man ihn, um das Einsaugen von heißen Verbrennungsgasen und Feuchtigkeit zu vermeiden, unter das Ende des Goldröhrchens und treibt mit Hilfe des „Dackelbrenners" das Quecksilber restlos in das Goldröhrchen. Nach Wiederholung dieses Erhitzens des Rohrendes bringt man eventuell an der Glaswandung kondensiertes Quecksilber durch vorsichtiges Bestreichen mit dem „Dackelbrenner" auf die Goldfüllung. Während dieser ganzen Operation ist darauf zu achten, daß die Stärke des Luftstromes dauernd größer bleibt als die des Kohlensäurestromes; es kommt nämlich manchmal vor, daß durch kondensiertes Wasser im Schnabel des Goldröhrchens der Luftstrom gehemmt wird, was aber durch stärkeres Saugen mit der MARIOTTE'schen Flasche leicht behoben werden kann. Außerdem ist wichtig, daß die Flamme des Bunsenbrenners ganz klein gestellt bleibt. Das Quecksilber destilliert schon bei einer Temperatur ab,

bei der ein Glühen der Drahtnetzrolle kaum zu beobachten ist. Erhitzt man höher, so destilliert bei Rotglut, gleichgültig ob nach ausgeführter Analyse oder nach einem Blindversuch, stets wenig einer gelben, öligen Substanz über, die natürlich die Quecksilberwerte fehlerhaft beeinflussen würde. Bei Einhaltung einer niedrigen Temperatur ist aber wegen der großen Verschiedenheit der Flüchtigkeit keinerlei Gefahr zu befürchten.

Nach beendetem Übertreiben wird mit der MARIOTTE'schen Flasche noch etwas stärker angesaugt und ihr Inhalt ($1^1/_2$ l) vollständig auslaufen gelassen. Während dieser Zeit wird auch die im Röhrchen niedergeschlagene Feuchtigkeit restlos abgeführt. Nun wird das Goldröhrchen abgenommen, nach PREGL zunächst feucht, dann trocken abgewischt und am besten gleich in der Waage hängend erkalten gelassen. Nach 20 bis 30 Minuten wird dann am sichersten unter Benützung eines gleichen Röhrchens als Tara gewogen.

Bei der experimentellen Durcharbeitung wurde so verfahren, daß zunächst in das normal gefüllte Verbrennungsrohr in einem Porzellanschiffchen abgewogene Quecksilberperlen gebracht wurden, die überdestilliert und im Goldröhrchen fast quantitativ wieder aufgefangen wurden.

Eingewogen: 4,563 mg Hg gefunden: 4,570 mg Hg = 100,15%.
Eingewogen: 5,224 mg Hg gefunden: 5,211 mg Hg = 99,75%.
Eingewogen: 0,987 mg Hg gefunden: 0,982 mg Hg = 99,49%.

Hierauf wurde eine Reihe anorganischer und stickstofffreier, organischer Quecksilberverbindungen der Analyse unterworfen, deren Quecksilbergehalt makroanalytisch überprüft, bezw. festgestellt wurde. Das Einwägen und Einfüllen der Substanz in das Verbrennungsrohr wurde wie bei der N-Bestimmung ausgeführt. Die folgende Zusammenstellung zeigt eine Reihe dabei gefundener Werte.

Substanz	Einwage in mg	mg Hg gef.	% Hg ber.	% Hg gef.	△% Hg
Quecksilberchlorid .	3,717	2,737	73,88[1])	73,64	−0,24
	4,645	3,424	73,88	73,71	−0,17
	3,906	2,894	73,88	74,09	+0,21

[1]) Für Quecksilberchlorid wurde makroanalytisch 73,82% Hg und für Quecksilberoxyd 92 51% Hg gefunden.

Substanz	Einwage in mg	mg Hg gef.	% Hg ber.	% Hg gef.	△% Hg
Quecksilberoxyd . .	4,334	3,996	92,61[1]	92,20	−0,41
	4,144	3 831	92,61	92,45	−0,16
	3,289	3.037	92,61	92,34	−0.27
Quecksilbersulfat . .	3.852	2,557	66,63[2]	66,38	−0.25
	4,005	2.660	66,63	66,42	−0,21
	3,726	2,468	66,63	66,24	−0,39
Hydrargyrum salic. .	6,468	3,589	55,82[2]	55,49	−0,33
	5,732	3,195	55,82	55,74	−0,08
	4,945	2,749	55,82	55,59	−0,23

[1]) Für Quecksilberchlorid wurde makroanalytisch 73,82% Hg und für Quecksilberoxyd 92,51% Hg gefunden. [2]) Der berechnete Wert beträgt für $HgSO_4$ 67,62% Hg, für Hydrargyrum salic. 59 59% Hg. Die mikroanalytisch gefundenen Werte wurden auf die makroanalytisch festgestellten Werte von 66,63, bezw. 55 .82% Hg bezogen, da bei ersterer Verbindung infolge wechselnden Wassergehaltes, bei letzterer durch Beimengung von Mercurisalicylsäuresalicylat die Hg-Werte die theoretischen nicht erreichten.

Da nur eine geringe Anzahl von analysenreinen, stickstoffhaltigen, organischen Quecksilberverbindungen zur Verfügung stand, wurde bei den folgenden Versuchen stets eine analysenreine Stickstoffverbindung und eine der oben analysierten Quecksilberverbindungen in das Mischröhrchen eingewogen, wie bei der N-Bestimmung mit feinem Kupferoxyd gemengt, in das Verbrennungsrohr eingefüllt und der Analyse unterworfen. Auch hier wurde beim Quecksilbersulfat und Hydrargyrum salic. der mikroanalytisch gefundene Wert auf den durch die Makroanalyse bestimmten Quecksilberwert bezogen. (Tabelle I.)

Bei diesen Versuchen wurden absichtlich Stickstoffverbindungen mit möglichst verschieden gebundenem Stickstoff gewählt.

In der folgenden Zusammenstellung II. sind die Ergebnisse der Analysen der stickstoffhaltigen Quecksilberverbindungen zusammengestellt.

Zum Schlusse wurden noch zwei Verbrennungen mit Phenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid durchgeführt, bei denen die Kohlensäure mit dem von W. Brunner[3]) angegebenen Bikarbonatröhrchen entwickelt wurde und das immer dann mit

[3]) W. Brunner, Dissertation Freiburg i. Breisgau (1914); vgl. auch Chem. Ztg. 38, S. 767 (1914).

größtem Vorteil angewendet werden kann, wenn kein luftleerer Kippapparat zur Verfügung steht. Im gegebenen Fall wurde es aber aus dem Grunde angewendet, um zu sehen, ob sich damit nicht die Bildung der oben erwähnten, schwer flüchtigen, öligen Substanz vermeiden läßt, was allerdings nicht der Fall war.

Substanz	Einw. in mg	gef. ccm N	ber. %N
$C_{10}H_{11}N_3 . HgCl_2$	5.155	0.442 (720mm, 19°C)	9.45
$C_{10}H_{11}N_3 . HgCl_2$	4.314	0.374 (720mm, 20°C)	9,45

gef. %N	△ %N	gef. mg Hg	ber. %Hg	gef. %Hg	△ %Hg
9.50	+ 0.05	2,319	45,12	44.99	— 0.13
9,57	+ 0,12	1,932	45,12	44,79	— 0,33

Was die gefundenen N-Werte anbelangt, so lassen sie nichts zu wünschen übrig und liegen innerhalb der üblichen Fehlergrenze. Die bei den Quecksilberwerten erreichte Genauigkeit von etwa 0,5% ist zufriedenstellend und dürfte wohl für weitaus die meisten Fälle ausreichend sein[4]), wenn sie auch der von VERDINO (l. c.) durch elektrolytische Abscheidung des Quecksilbers erhaltene von etwa 0,2% nachsteht. Die MEIXNER-KRÖCKER'sche Methode (l. c.) der Hg-Bestimmung bietet dafür den Vorteil der kürzeren Dauer und der jederzeit leicht zu beschaffenden Apparatur.

Die Gewichtskonstanz des mit Quecksilber beladenen Goldröhrchens hängt wesentlich davon ab, ob alles Quecksilber amalgamiert oder ein Teil desselben an den Glaswandungen kondensiert ist. Im ersteren Falle beträgt der Gewichtsverlust beim Hängen in der offenen Waage, wohl wegen der geringen Berührungsfläche des Amalgams mit der Luft, nur 0.0001 bis 0.002 mg st, während im letzteren Falle der Gewichtsverlust bis zu 0.016 mg st ansteigen kann. Daß die Gewichtskonstanz mit wachsender Quecksilbermenge abnimmt, ist verständlich und es ist daher vorteilhaft, nach jeder Bestimmung das Quecksilber aus dem Goldröhrchen abzutreiben, was unter Durchleiten von Luft, durch schwaches Erwärmen rasch und mühelos erreicht werden kann. Fallweise wurde das Goldröhrchen auch mit Schwefelchromsäure gereinigt.

[4]) Wie weit diese Methode auch bei jodhaltigen Verbindungen brauchbare Hg-Werte liefert, ist nicht untersucht worden.

Tabelle I.

Substanz	Einwage in mg	gef. ccm N	ber. %N	gef. %N	△ %N	gef. mg Hg	ber. % Hg	gef. %Hg	△ %Hg
$NH_2C_6H_4(CH_3)_2C_2N_3$ [1] $HgCl_2$	2,435 5,423	0,656 (719 mm, 20° C)	29,78	29,69	— 0,09	3,972	73,88	73,24	— 0,64
$C_{11}H_{11}O_2N_3 . HNO_3$ [2] $HgCl_2$	3,242 4,887	0,590 (719 mm, 20° C)	20,00	20,06	+ 0,06	3,614	73,88	73,95	+ 0,07
$C_6H_5NHOCCH_3$ [3] HgO	4,535 4,212	0,421 (717 mm, 18° C)	10,37	10,28	— 0,09	3,889	92,61	92,33	— 0,28
$C_6H_5NHOCCH_3$ [3] HgO	5,002 3,123	0,465 (716 mm, 17° C)	10,37	10,31	— 0,06	2,885	92,61	92,38	— 0,23
$(C_4H_7O)_2NH$ [4] $HgSO_4$	5,433 5,450	0,444 (719 mm, 20° C)	8,92	9,01	+ 0,09	3,625	66,63	66,51	— 0,12
$C_{10}H_{10}N_3 . NO_2$ } [5] $C_6H_3N_3O_7$ } $HgSO_4$	3,145 6,333	0,624 (720 mm, 20° C)	21,93	21,91	— 0,02	4,233	66,63	66,84	+ 0,21
$C_2N_3(CH_3)_2C_6H_4 . N$ ‖ } [6] $C_2N_3(CH_3)_2C_6H_4 . N$ } Hydrarg. salic.	1,797 6,482	0,489 (719 mm, 19° C)	30,11	30,10	— 0,01	3,581	55,82	55,25	— 0,57
$NO_2C_6H_4(CH_3)_2C_2N_3$ [7] Hydrarg. salic.	3,101 5,343	0,716 (719 mm, 19° C)	25,69	25,54	— 0,15	2,964	55,82	55,47	— 0,35

[1]) p-Amidophenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4. [2]) p-Karboxylphenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-nitrat. [3]) Acetanilid. [4]) Diisobutyramid. [5]) p-Nitrophenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-pikrat. [6]) p-Azophenyl-1-dimethyl 3, 5-triazol-1, 2, 4-. [7]) p-Nitrophenyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4.

Tabelle II.

Substanz	Einwage in mg	gef. ccm N	ber. %N	gef. %N	△ %N	gef. mg Hg	ber. %Hg	gef. %Hg	△ %Hg
$C_{11}H_{13}NO \cdot HgCl_2$[1]	6,181	0,186 (720 mm, 18°C)	3,14	3,34	+ 0,20	2,745	44,91	44,41	— 0,50
$C_{11}H_{13}NO \cdot HgCl_2$	8,926	0,263 (720 mm, 20°C)	3,14	3,25	+ 0,11	3,984	44,91	44,63	— 0,28
o-$C_{11}H_{13}N_3 \cdot HgCl_2$[2]	7,991	0,666 (719 mm, 18°C)	9,16	9,25	+ 0,09	3,475	43,74	43,49	— 0,25
o-$C_{11}H_{13}N_3 \cdot HgCl_2$	4,001	0,340 (719 mm, 19°C)	9,16	9,40	+ 0,24	1,761	43,74	44,01	+ 0,27
m-$C_{11}H_{13}N_3 \cdot HgCl_2$[3]	6,661	0,543 (719 mm, 19°C)	9,16	9,02	— 0,14	2,885	43 74	43,31	— 0,43
m-$C_{11}H_{13}N_3 \cdot HgCl_2$	3.896	0,329 (719 mm, 20°C)	9,16	9,31	+ 0,15	1,693	43,74	43,46	— 0,28
m-$C_{11}H_{13}N_3HCl \cdot HgCl_2$[4]	5,999	0,450 (720 mm, 20°C)	8.49	8,28	— 0,21	2,450	40,52	40,84	+ 0,32
m-$C_{11}H_{13}N_3HCl \cdot HgCl_2$	4,321	0,333 (720 mm, 18°C)	8,49	8,56	+ 0,07	1,761	40,52	40,76	+ 0,24
p-$C_{11}H_{13}N_3 \cdot HgCl_2$[5]	6,776	0,568 (720 mm, 19°C)	9,16	9,28	+ 0,12	2,935	43,74	43,32	— 0,42
p-$C_{11}H_{13}N_3 \cdot HgCl_2$	5,586	0,474 (720 mm, 19°C)	9,16	9,40	+ 0,24	2,443	43,74	43,73	— 0,01
$(C_{11}H_{13}N_3)_43HgCl_2$[6]	7,002	0,691 (721 mm, 20°C)	10,75	10,91	+ 0 16	2,719	38,50	38,83	+ 0,33
$(C_{11}H_{13}H_3)_43HgCl_2$	4,296	0,419 (721 mm, 18°C)	10,75	10,85	+ 0,10	1,651	38,50	38.43	— 0,07

[1]) N-methyl-3,3-dimethyl-indolinonquecksilberchlorid. [2]) o-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid. [3]) m-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid. [4]) Salzsaures m-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid. [5]) p-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid. [6]) p-Tolyl-1-dimethyl-3, 5-triazol-1, 2, 4-quecksilberchlorid-doppelsalz.

Es sei noch darauf hingewiesen, daß nach jeder Bestimmung die sich bei der Verbrennung bildende, schwer flüchtige, ölige Substanz aus dem Verbrennungsrohr durch entsprechendes Erhitzen ausgetrieben wurde; sie verbrennt mit stark leuchtender Flamme und färbt die Flamme des Bunsenbrenners grün.

Daß diese Methode der Quecksilberbestimmung — und das ist sicherlich ein gewisser Nachteil — ein reines und sehr genaues Arbeiten erfordert, daß jede Wägung unbedingt nur mit Berücksichtigung des Nullpunktes und eventueller Fehler des Gewichtssatzes ausgeführt werden muß, braucht wohl kaum erwähnt zu werden.

Eine Mikromethode zur Bestimmung der Cerebroside.

Von **Paul Kimmelstiel.**

(Aus der Chem. Abt. d. Physiolog. Instituts in Breslau, Vorst. Prof. E. SCHMITZ.)

(Eingelangt am 2. Mai 1929.)

Obgleich wir über die chemische Konstitution der Cerebroside gut unterrichtet sind, wissen wir fast nichts über die Art und Weise, wie sich diese Körper an den Stoffwechselvorgängen beteiligen. Dabei ist jedoch schon von vornherein anzunehmen, daß die Rolle, die sie spielen, keine unwesentliche sein kann; denn sie sind schon ihrer Masse nach mit 9% (nach THIERFELDER 13%) der Trockensubstanz am Aufbau des Gehirns beteiligt. Auch in einigen anderen Organen sind sie nachgewiesen worden. Von der Pathologie her wissen wir sogar, daß sehr bedeutsame Änderungen des Cerebrosidgehaltes der Organe auftreten können, so z. B. bei der Splenomegalie Gaucher, bei der ungeheuer große Mengen Galaktosids in der Milz gespeichert werden[1]) können. Ferner weiß man durch die Untersuchungen NOLL's[2]), daß bei der Degeneration der peripherischen Nerven die Cerebroside in großem Maßstabe abgebaut werden. Dann hat man auch bei der Untersuchung der Lipoide in atherosklerotischen Aorten (SCHÖNHEIMER)[3]) Cerebroside gefunden, und es ist durchaus wahrscheinlich, daß man bei entsprechend darauf gerichteter Aufmerksamkeit auch bei anderen Erkrankungen, die mit verändertem Lipoidgehalt des Blutes und der Organe einhergehen, eine Beteiligung der Cerebroside wird feststellen können.

Allerdings fehlt es bisher an geeigneter Methodik, die Cerebroside in kleinen Mengen quantitativ zu erfassen. Alle bisherigen Untersuchungen (mit Ausnahme der Arbeiten von NOLL und WINTERSTEIN) beruhen auf der präparativen Darstellung, die natürlich nur unter Anwendung entsprechend großer Mengen durchführbar sind. Das Verfahren von NOLL besteht in der Bestimmung der durch vorsichtige Hydrolyse aus dem Cerebrosid

---

[1]) EPSTEIN, E., Biochem. Zeitschr. 145, 398 (1924); LIEB, H., Zeitschr. für physiol. Chemie 140, 305 (1925).

[2]) NOLL, A., ebda. 27, 370 (1899).

[3]) SCHÖNHEIMER, R., ebda. 177, 143 (1928).

freigemachten Galaktose mit Hilfe der BERTRAND'schen Reduktionsmethode. Das Verfahren ist jedoch umständlich, dauert sehr lange und es haften ihm — wie ich später zeigen werde — gewisse grundsätzliche Mängel an. Auf dem gleichen Prinzip ist auch die Methode von WINTERSTEIN und HIRSCHBERG[4]) aufgebaut, nur ist hier die Zeitdauer der Bestimmung wesentlich verkürzt, und durch die Anwendung der GREINER'schen Modifikation der BERTRAND-schen Methode kommt man mit wesentlich kleineren Mengen der Ausgangssubstanz aus. Inwieweit jedoch bei diesem relativ einfachen Verfahren Fehler unterlaufen können, insbesondere durch Mitbestimmung anderer reduzierender Substanzen, ist nicht abzuschätzen. Deshalb besteht auch heute noch der Satz THIERFELDER's zu Recht: „Ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung (der Cerebroside), von dem festgestellt ist, daß es zuverlässige Resultate gibt, kennt man zurzeit nicht." Diese Lücke auszufüllen, bin ich bestrebt gewesen.

Das hier anzugebende Verfahren, dessen Brauchbarkeit an rein dargestellten Cerebrosiden nachgeprüft wurde, bringt grundsätzlich nichts Neues. Es basiert auf den gleichen Voraussetzungen wie die NOLL'sche Methodik: hydrolytische Abspaltung des Zuckers und Bestimmung desselben. Es ist lediglich versucht worden, durch Anwendung der Zuckerbestimmung nach HAGEDORN-JENSEN die bestimmbare Galaktosemenge noch weiter zu verringern und, soweit es möglich ist, die oben angegebenen Fehler zu beseitigen. Die Bestimmung ist möglichst vereinfacht, um Reihenuntersuchungen vornehmen zu können. Mit ihrer Hilfe wird es vielleicht möglich sein, etwas Näheres über die Beteiligung der Cerebroside am Stoffwechsel etwa auf experimentellem Wege zu erfahren.

Im folgenden nehme ich eine kurze Zusammenstellung der einzelnen Phasen der Bestimmung vorweg, die ich danach im einzelnen kritisch auswerten möchte.

1. Extraktion in heißem Alkohol.
2. Hydrolyse des eingedampften Extraktes mit Salzsäure.
3. Neutralisation der salzsauren, galaktoschaltigen Lösung.
4. Bestimmung der reduzierenden Substanz nach HAGEDORN-JENSEN (Hydrolysebestimmung).
5. Bestimmung der reduzierenden Substanzen, die vor der

[4]) WINTERSTEIN, H., und HIRSCHBERG, Biochem. Zeitschr. 159, 351 (1925).

Hydrolyse im alkoholischen Extrakt vorhanden sind (Anfangsbestimmung).

Der Wert für den Cerebrosidzucker ergibt sich als Differenz zwischen Hydrolysebestimmung (4) minus Anfangsbestimmung (5), und wird mit 4,6 (THIERFELDER) multipliziert, um den Cerebrosidwert zu erhalten.

Ad 1: Das lebendfrische Gehirnmaterial (die folgenden Zahlen beziehen sich auf etwa 250 mg Frischgewicht) wird in flüssiger Luft zu einem feinen Pulver zerrieben und noch im gefrorenen Zustand in einem mit Alkohol gefüllten Kölbchen abgewogen. In mehrfach zu wechselndem, siedendem 96%igem Alkohol wird bis zur Erschöpfung extrahiert. Die alkoholische Lösung wird — noch heiß — quantitativ mit heißem Alkohol in ein 25-ccm-Kölbchen überführt und nach dem Erkalten auf Zimmertemperatur zur Marke aufgefüllt. Dabei fällt ein feiner, weißlicher Niederschlag (substance blanche) aus, der längere Zeit in der Schwebe bleibt. Das etwas umständliche Aufnehmen des lebendfrischen Materials in flüssige Luft hat sich auf Grund von Versuchen, die ich gemeinsam mit Herrn Dr. JUNGMANN (vom physiologischen Institut in Breslau, Prof. WINTERSTEIN) machte, als notwendig erwiesen. Es hat sich nämlich gezeigt, daß sich die Galaktoside beim Stehenlassen des Gehirnmaterials an der Luft unerwartet rasch zersetzen. Für alle Einzelheiten muß ich auf die in aller Kürze erscheinende Arbeit verweisen.

Ad 2: Die Lipoidlösung wird gut umgeschüttelt und 3 ccm werden in ein „Hydrolysekölbchen" pipettiert. Als solches wird ein kleiner Rundkolben von 50 ccm Inhalt aus Jenaer Glas benutzt, in dessen langem Hals ein Glasstöpsel eingeschliffen ist, der durch eine Metallklammer festgehalten werden kann. Bei gleichzeitiger Ausführung mehrerer Bestimmungen werden die Hydrolysekölbchen in ein hierfür angefertigtes Metallgestell senkrecht eingesetzt, in ein Wasserbad versenkt und bei kochendem Wasser bis zur vollständigen Trockenheit eingedampft. Nach Zugabe von 4 ccm 11%iger Salzsäure werden die Kölbchen fest verschlossen, zugeklammert und in einem Hitzeschrank in ihrer aufrechten Lage 15 bis 18 Minuten bei 112° gelassen. Die Flüssigkeit darf hierbei nicht ins Sieden geraten. (Die fixierte Haltung des Kölbchens und der Überschuß an Salzsäure ist nötig, damit das eingetrocknete Material mit Sicherheit von Flüssigkeit bedeckt bleibt.) Bei beendigter Hydrolyse hat sich das Material von der Glaswand rest-

los abgelöst und schwimmt als feines, weißes Häutchen an der Oberfläche. Nach dem Erkalten wird die Flüssigkeit mitsamt dem leicht zerfallenden Häutchen unter mehrfachem Nachwaschen mit Aqu. dest. quantitativ in ein 10-ccm-Meßkölbchen mit eingeschliffenem Glasstöpsel überführt. Es wird durch ein kleines, gehärtetes Filter filtriert. Das Filtrat muß vollkommen klar sein.

Die Hydrolyse mit 11%iger Salzsäure habe ich aus der Arbeit von WINTERSTEIN übernommen, der festgestellt hatte, daß eine Schädigung der Galaktose während des halbstündigen Kochens nicht eintritt. Auch für meine Hydrolysebedingungen habe ich mit reiner Galaktoselösung bestätigen können, daß ein Verlust an Reduktionskraft nicht erkennbar ist. Auch bei größeren Mengen konnte ich bei Anstellung der qualitativen Probe ein Auftreten von Lävulinsäure nicht nachweisen. Daß ferner die angegebene Zeit von 15 bis 18 Minuten die optimale ist, ergibt sich aus der nachfolgenden Tabelle[5]). Die Werte wurden erhalten aus einer zu diesem Zwecke hergestellten größeren Extraktmenge aus getrocknetem Hirnmaterial.

Tabelle I.

0,2 g Trockensubstanz (Gehirn). Alkoholischer Extrakt, aufgefüllt auf 100 ccm. Davon 5 ccm zur Hydrolyse und 5 ccm zur Anfangsbestimmung. Das Hydrolysat, aufgefüllt auf 10 ccm. Von dem Filtrat 7 ccm zur Reduktionsbestimmung.

Die Hydrolyse ist bei 110° ausgeführt.

Zeit	ccm n/200 $Na_2S_2O_3$	mg Galaktose	mg Cerebrosidzucker	% Cerebrosid
15 Minuten	0,75	0,280	0,140	9,20
20 „	0,76	0,278	0,138	9,06
45 „	0,90	0,244	0,104	6,85
60 „	0,92	0,240	0,100	6,58
Salzwert	1,85	0,030		
Blindwert	1,95	0,010		
Anfangswert	1,44	0,120		

[5]) Diese Werte gelten für einen von unten her mit Gas geheizten Trockenschrank; späterhin habe ich mit einem elektrisch heizbaren, mit Thermoregulator versehenen Trockenschrank gearbeitet, der so eingestellt wurde, daß die Temperatur in der Höhe der Hydrolysekölbchen 112° betrug. Hierfür mußte ich als Optimum die Zeit von 30 Minuten feststellen. Demnach empfiehlt es sich also für den jeweils zu benutzenden Schrank ein für allemal eine Optimumkurve zu bestimmen.

Die hydrolysierte Flüssigkeit muß nach dem Filtrieren völlig klar sein, denn es hat sich herausgestellt, daß die Reduktionswerte unregelmäßig und zu hoch sind, wenn Teile der feinen Flocken das Filter passieren.

Auch ein in diesem Sinne angestellter Versuch mit rein dargestelltem Cerebrosid ergab das gleiche. Statt der Filtration wurde hier gleich die ganze Menge der Flocken mit in das Hagedornröhrchen übergespült. Während der Vergleichsversuch die etwa richtige Zahl von 0,98 mg Cerebrosid ergab, erhielt ich hier 1,099 mg, also fast 10% zuviel. Eine Erklärung: die Oxydation der abgespaltenen Restbestandteile (Sphingosin oder die Fettsäure) liegt zwar auf der Hand, ist aber nicht nachgeprüft.

A d 3. Eine bestimmte Menge des klaren Filtrates (zirka 7 ccm) werden in ein Präparatenglas nach HAGEDORN-JENSEN pipettiert und mit einem Tropfen 0,1%iger Methylrotlösung versetzt. Dann wird mit etwa 15%iger Natronlauge (e natrio) bis zum Umschlag in Gelb neutralisiert. (Es ist ratsam, die Natronlauge vorher etwa fünf Minuten zu kochen, um die Eigenreduktionskraft zu verringern.) Nun wird bis zum ersten Umschlag in Rosa n/5 Salzsäure zugegeben und mit n/10 NaOH bis zum bleibenden, deutlichen Umschlag in Gelb versetzt. Danach wird noch einmal 1 ccm n/10 NaOH zugegeben.

Dieser Alkaleszenzgrad ist nach langen Vorversuchen (auch mit anderen Indikatoren) als der richtige befunden worden. Tabelle II zeigt Versuche mit verschiedenen Alkaleszenzgraden, die angestellt wurden mit einer beliebigen Menge hydrolysierten Alkoholextraktes. Tabelle III stellt eine Auswertung des Alkaleszenzpunktes mit reiner, abgemessener Galaktosemenge dar.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß durch Zusatz von 1 ccm n/10 Natronlauge zu dem durch den Umschlag von Methylrot angezeigten Neutralpunkt die richtigen Zuckerwerte erhalten werden, daß ferner eine gewisse Schwankungsbreite im Zusatz von Natronlauge über den genannten Punkt hinaus gegeben ist, ohne daß sich die Werte merklich ändern.

Erst später fand ich die Angabe von MEYERHOF und LOHMANN[6]), die zur Glykogenbestimmung ebenfalls die salzsaure Hydrolyselösung neutralisierten und die freigewordene Glukose bestimmten. Sie benutzten als Indikator Phenolphtaleïn. Wie die

[6]) MEYERHOF, O., und LOHMANN, Biochem. Zeitschr. 171, 381 (1926).

Tabelle II.

Hydrolyse und Anfangsbestimmung gleiche Mengen eines Extraktes. Die Anfangsbestimmung wird nach dem Kochen (kalt) mit HCl versetzt und auf die jeweils gleiche Art wie die Hydrolysebestimmung alkalisiert.

(Neutral = Umschlag des Methylrot in Gelb mit n/10 NaOH.)

	mg Galaktose Hydrolyse	Anfangsbst.	Hydrolyse abzügl. Anfangsbst. mg. Galaktose
Neutral	0,193	0,085	0,108
Neutral + 1 ccm n/10NaOH	0,202	0,089	0,113
„ 3 ccm „	0,190	0,083	0,107
„ 0,1 ccm 33%NaOH	0,226	0,142	0,080
„ 0,2 ccm „	0,292	0,198	0,094

Tabelle III.

Zu einer abgemessenen Menge Galaktoselösung (entspr. 0,20 mg Galaktose) werden 4 ccm 11% HCl hinzugefügt und neutralisiert. (Neutral = Umschlag des Methylrot in Gelb mit n/10 NaOH.)

Bei dem „Salzwert" in gleicher Weise verfahren, nur ohne Zucker.

mg. Galaktose	Behandlung	ccm n/200 $Na_2S_2O_3$	mg. Galaktose abzüglich Salzwert
0,20	—	1,09	0,200
„	—	1,09	0,200
—	—	2,00	—
0,20	neutr. + 0,5 ccm n/10 NaOH	0,88	
„	„ + „ „	0,90	0,213
—	„ + „ „	1,83	
0,20	„ + 1,0 ccm „	0,88	
„	„ + „ „	0,90	0,202
—	„ + „ „	1,78	
0,20	„ + 1,5 ccm „	0,92	
„	„ + „ „	0,92	0,196
—	„ + „ „	1,78	
0,20	„ + 2,0 ccm „	0,96	
„	„ + „ „	0,92	0,173
—	„ + „ „	1,71	

umstehende Tabelle V zeigt, konnte ich mit dieser Methodik bei den von mir benutzten Mengen brauchbare Resultate nicht erzielen. Allerdings ist zu bemerken, daß ich im Gegensatz zu MEYERHOF und LOHMANN nur mit der vorgeschriebenen Menge n/200 Ferrizyankaliumlösung (2 ccm) gearbeitet habe, und daß ich die Nachprüfung — wie für meine Zwecke erforderlich — mit Galaktoselösung anstellte, die gegen einen veränderten Alkaleszenzgrad sehr viel empfindlicher ist als Glukose[7]).

Durch die Zugabe von Salzsäure und Natronlauge wird (wie das auch MEYERHOF und LOHMANN bemerken) schon eine gewisse Titerabnahme des Ferrizyankaliums bewirkt, die aber, wie ich feststellte, als immer gleichbleibender „Salzfehler" ausgeschaltet werden kann. Es kommt also zu einer Serie mit gleichen Mengen Salzsäure angesetzter Hydrolysen eine Salzbestimmung in der Weise hinzu, daß die betreffende Menge Salzsäure (in unserem Falle 4 ccm) in der oben beschriebenen Weise neutralisiert und nach HAGEDORN-JENSEN bestimmt wird.

Ad 4. Die so neutralisierten Flüssigkeiten (Hydrolyse- und Salzbestimmung) werden in dem geeichten Präparatenglas auf 17 ccm mit Aqu. dest. aufgefüllt und nach Zusatz von 2 ccm n/200 Ferrizyankaliumlösung wird die Bestimmung in der vorgeschriebenen Weise zu Ende geführt.

Da bekanntlich die Galaktose dem Ferrizyankalium gegenüber ein etwas anderes Reduktionsvermögen aufweist als Glukose, hat es sich als notwendig herausgestellt, eine entsprechende neue Galaktosekurve aufzustellen, die aber — wie besonders betont werden muß — auf ein Flüssigkeitsvolumen von 17 ccm bezogen ist. (Tabelle am Schlusse der Arbeit.) Es wurde zur Aufstellung der Kurve das Galaktosepräparat „reinst" von MERCK benutzt, das längere Zeit bei 50° und über Schwefelsäure getrocknet war. Mit dieser reinen Galaktoselösung wurde dann auch nachgewiesen, daß innerhalb des hier angegebenen Tabellenbereiches der Zusatz von Salzsäure und Natronlauge belanglos ist, wenn der dafür austitrierte Salzfehler abgezogen wird. Dabei wurde so vorgegangen, daß eine genau abgewogene Menge Galaktose in Aqu. dest. gelöst, entsprechend verdünnt und die Lösung aus einer Mikrobürette in die Präparatengläser abgelassen wurde. Hierzu kam überall die gleiche Menge 11%iger Salzsäure, es wurde in der

[7]) PUCHER u. FINSCH, Journ. of biolog. Chemistry, V. 76, 1928, S. 331.

angegebenen Weise neutralisiert und die Reduktionsbestimmung angeschlossen. Die nachfolgenden Zahlen, die zehn Punkten der Galaktosekurve entsprechen, zeigen die gute Übereinstimmung in allen Bereichen.

Tabelle IV.

abgemess. mg Galaktose	wiedergefunden: + HCl + NaOH — „Salzwert" abgezogen		unbehandelt
0,040	0,090	0,046	0,040
0,080	0,120	0,076	0,076
0,120	0,158	0,114	0,118
0,160	0,204	0,160	0,160
0,200	0,244	0,200	0,202
0,240	0,288	0,244	0,240
0,280	0,322	0,278	0,278
0,320	0,360	0,316	0,311
0,360	0 ,400	0,356	0,362

Der „Salzwert" entspricht einer scheinbaren Galaktosemenge von 0,044 mg.

In ganz derselben Weise wurden auch die Angaben Meyerhof's nachgeprüft. Es zeigte sich aber, wie aus Tabelle V ersichtlich ist, daß schon der Salzwert außerordentlich hoch ist. Nach dessen Abzug kommt man jedoch nicht auf den gewünschten Wert.

Tabelle V.

Bestimmte Mengen einer Galaktoselösung werden auf dreifache Weise mit der Hagedorn-Jensen-Methode bestimmt:

1. Lösung in Aqu. dest., unbehandelt.
2. Lösung in Aqu. dest. plus 4 ccm 11% HCl, neutral. gegen Methylrot.
3. Lösung in Aqu. dest. plus 4 ccm 11% HCl, neutral. gegen Phenolphtalëin nach der Methode von Meyerhof und Lohmann.

Unbehandelt	Methylrot	Phenolphtalein
0,040	0,041	0,099
0,116	0,118	0,069
0,191	0,193	0,143
0,296	0,298	0,200

A d. 5. Zur Anfangsbestimmung genügen 2 ccm der gut umgeschüttelten, alkoholischen Lösung, die unmittelbar in das Prä-

paratenglas hineinpipettiert und im siedenden Wasserbad zur vollständigen Trockne abgedampft werden. Spuren zurückbleibenden Alkohols können die nachfolgende Reduktionsbestimmung auf das empfindlichste stören. Zu dem eingedampften Extrakt werden 4 bis 5 ccm Wasser hinzugegeben und 10 bis 15 Minuten im siedenden Wasserbad gehalten. Es bildet sich eine trübe Emulsion, in der auch größere Flocken schwimmen. Nach dem Auffüllen auf 17 ccm werden 2 ccm Ferrizyankalium hinzugesetzt und die Ansätze in der üblichen Weise weiter behandelt[8]).

Dieser so erhaltene Anfangswert in Galaktose ausgedrückt, enthält alle diejenigen reduzierenden Substanzen, die auch ohne Hydrolyse unmittelbar nachweisbar sind. Unter der Voraussetzung, daß diese Stoffe ihren Reduktionswert unter den Hydrolysebedingungen nicht verringern, sind wir genötigt, diesen Wert vom Hydrolysewert abzuziehen, weil er ja darin mit enthalten ist. Erst auf diese Weise erhalten wir den Reduktionswert, der nur dem nach der Hydrolyse abgespaltenen Stoff entspricht. Hierfür kommt nur die Galaktose der Cerebroside in Frage. Der Anfangswert ist keineswegs unbeträchtlich und darf nicht — wie das bisher immer geschehen ist — vernachlässigt werden.

Ich habe im einzelnen nicht alle Stoffe verfolgt, die diesen Anfangswert ausmachen, nur dem Kreatin habe ich besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Denn hier liegt der besondere Fall vor, daß sich unter den Bedingungen der Hydrolyse der anfangs niedrige Reduktionswert erhöhen könnte. Es war nämlich anzunehmen, daß das im Gehirn fast ausschließlich vorhandene Kreatin sich bei der Erhitzung mit Salzsäure in Kreatinin umwandeln würde. Nun ergibt aber das Kreatinin bei der Reduktion mit Ferrizyankali einen viel höheren (nach Holmes[9]) einen doppelt so hohen) Wert als das Kreatin und es würde demnach der Hydrolysewert um so viel zu hoch sein, als das Plus des Reduktionswertes vom neugebildeten Kreatinin gegenüber dem Kreatin ausmachen würde. Alles kam also darauf an, wieviel Kreatin und

[8]) Ich habe späterhin diese Anfangsbestimmung dahingehend abgeändert, daß ich nach dem Kochen in Wasser eine Fällung mit Zinksulfat-Natronlauge vornahm. Die Begründung und genauere Beschreibung erfolgt demnächst in der Bioch. Zeitschrift in einer kleinen Mitteilung als „Fortgesetzte Cerebrosiduntersuchung". Für die ersten experimentellen Untersuchungen ist aber die hier angegebene Methodik benutzt worden.

[9]) Holmes, B. E., Biochemical journal 20, 595 (1926), 21, 412 (1927).

wieviel Kreatinin in der sogenannten Anfangsbestimmung enthalten sind. Je größer der Anteil an Kreatin ist, um so größer muß der Fehler sein, je größer der Kreatininanteil ist, um so kleiner ist der Fehler, denn in dem letzteren Falle würde das gesamte Kreatinin aus der Hydrolysebestimmung herausgestrichen werden können.

Zunächst stellte ich erst einmal fest, daß tatsächlich bei der hier angewandten Extraktionsart das Kreatin quantitativ in den Alkohol überging. Ein alkoholischer Hirnextrakt wurde hydrolysiert, filtriert und nach der Neutralisation wurde mit Pikrinsäure kolorimetrisch sein Gehalt an Kreatinin festgestellt. Es war in drei verschiedenen Extrakten eines Kaninchengehirns

0,0923%
0,0910%
0,0929%

Gesamtkreatinin enthalten. (Beker[10]) findet z. B. 0,051 bis 0,071%.) Um nun das Verhältnis von Kreatin zu Kreatinin in der „Anfangsbestimmung" ausfindig zu machen, wurde folgendermaßen verfahren: In einer etwas größeren Extraktmenge wurde in gewöhnlicher Weise eine Anfangsbestimmung angesetzt. Nach dem Kochen wurde mit Trichloressigsäure gefällt und durch ein gehärtetes Filter filtriert. Ein Teil dieses völlig klaren Filtrates wurde sofort auf seinen Gehalt an Kreatinin untersucht, ein anderer Teil erst nach einem 15 Minuten langen Aufenthalt bei 110° nach Zusatz von soviel Salzsäure, daß die Lösung 11% HCl enthielt. In diesem zweiten Teil war in mehrfach wiederholten Versuchen immer nur ein Plus von 11 bis 12% gegenüber dem ersten Teil festzustellen. Das besagt also, daß nur 11 bis 12% des gesamten Kreatin-Kreatiningehaltes der „Anfangsbestimmung" als Kreatin, 88 bis 89% als Kreatinin vorhanden sind. Dadurch verringert sich der Fehler also außerordentlich. Er besteht lediglich darin, daß 11 bis 12% des in der Hydrolysebestimmung erscheinenden Kreatinins in der Anfangsbestimmung nur mit zirka halber Reduktionskraft als Kreatin in Erscheinung treten. Da ich nicht genau weiß, den wievielten Teil der gesamten Anfangsbestimmung das Kreatinin darstellt, so setze ich zur Berechnung des größtmöglichen Fehlers den Anfangswert gleich dem gesamten Kreatinin (in Wirklichkeit ist weniger Kreatinin darin enthalten). In diesem Falle würden (nach dem in Tabelle I

[10]) Beker, J. C., Zeitschr. f. physiol. Chem. 87, 21 (1913).

angegebenen Beispiel) 11% von 0,109 mg = 0,012 mg nur als Kreatin reduzieren, das heißt, der Hydrolysewert wäre um 0,006 mg zu hoch (zirka ein Tropfen n/200 Thiosulfat). Abgesehen davon, daß schon dieser Wert beinahe in die Fehlergrenze der Titrationsmethodik fällt, ist ja in Wahrheit der Fehler noch kleiner, weil erstens der Kreatiningehalt nur einen Teil des Anfangswertes ausmacht, und weil sich zweitens dieser „Fehler" bei allen Bestimmungen in der gleichen Richtung bewegt, und sich somit bei Vergleichsbestimmungen mehr oder weniger ausgleicht.

Nachdem somit — soweit es zu übersehen ist — alle Fehlerquellen ausgeschaltet waren, wurde die Methodik an reinem Cerebrosid nachgeprüft, das nach der von THIERFELDER angegebenen Methodik aus Menschengehirn hergestellt wurde. Das Cerebrosid, das wir in reinen, weißen Kristallen erhielten, unterschied sich in seinen Lösungsbedingungen deutlich von dem im Protagongemenge enthaltenen Cerebrosid: während nämlich die ungereinigte „substance blanche" noch lange Zeit nach dem Erkalten in der Schwebe bleibt, fällt das reine Cerebrosid, das in warmem, 96%igem Alkohol gelöst ist, bei dem Erkalten auf 28 bis 30° aus und senkt sich sehr rasch zu Boden. Aus diesem Grunde also war es nötig, bei Bestimmung der reinen Cerebrosidlösung warm, bei gemessener Temperatur abzupipettieren und diesen Fehler entsprechend dem Ausdehnungskoeffizienten des Alkohols einzurechnen. Tabelle VI gibt die erhaltenen mg Galaktóse und Cerebrosid aus 2 ccm von 100 ccm, in denen 0,1 g Cerebrosid gelöst waren. Das Überpipettieren geschah bei einer Temperatur von zirka 40°.

Tabelle VI.

0,100 g reinen Cerebrosids werden in 100 ccm Alkohol gelöst. Davon gelangen je 2 ccm zur Hydrolyse, von dem auf 10 ccm aufgefüllten Filtrat 5 ccm zur Reduktionsbestimmung (= 1 mg Cerebrosid).

Die Temperatur beträgt beim Überpipettieren 40°, entspricht rund einem Fehler von 4%.

	ccm n/200 $Na_2S_2O_3$		ccm n/200 $Na_2S_2O_3$
Hydrolyse	0,82 0,82 0,84 0,84	= 0,261 mg G. Salzwert	1,84 1,83 1,82 1,83 = 0,033 mg G.

Anfangsbst. $\left.\begin{matrix}1{,}82\\1{,}82\\1{,}83\\1{,}83\end{matrix}\right\}$ = 0,034 mg G. Titer $\left.\begin{matrix}1{,}94\\1{,}95\end{matrix}\right\}$ = 0,011 mg G.

Hydrolyse brutto in mg Galaktose	0,261
Salzwert „ „ „	— 0,033
Hydrolyse netto „ „ „	= 0,228
Anfangsbst. brutto in mg Galaktose	0,034
Leerwert „ „ „	— 0,011
Anfangsbst. netto „ „ „	= 0,023
Cerebrosidzucker:	= 0,228
	— 0,023
	0,205 mal 4,6 =
Cerebrosid:	0,943 mg + 4% =
	0,9830 „

Tabelle zur Ermittlung der Galaktosemenge aus dem Thiosulfatverbrauch.

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0								450	448	445
0,1	443	440	438	435	433	430	428	425	423	420
0.2	417	415	413	410	407	404	402	400	398	394
0,3	392	390	387	384	382	379	377	374	372	368
0,4	367	364	362	359	356	354	351	349	346	342
0,5	340	338	336	333	330	327	325	322	320	318
0,6	316	314	311	308	306	304	302	299	297	294
0,7	292	290	288	285	283	280	278	275	273	271
0,8	269	266	264	261	259	256	254	252	249	247
0,9	244	242	240	237	235	232	230	228	226	224
1,0	221	218	216	214	211	209	207	204	202	200
1,1	198	195	193	190	188	186	184	181	179	177
1,2	174	172	170	167	165	162	160	158	155	153
1,3	151	148	146	144	142	140	138	135	133	131
1,4	129	126	124	122	120	118	115	113	111	109
1,5	106	104	102	100	098	096	094	092	089	087
1,6	085	083	080	078	076	074	071	069	067	064
1,7	062	060	058	055	053	051	049	046	044	042
1,8	040	038	036	033	032	030	028	026	024	022
1,9	020	018	016	014	012	010	008	006	004	002

ccm n/200 Thiosulfat = 0, ... mg Galaktose

Es muß dazu bemerkt werden, daß die letzte Reinigung der Cerebroside mit dem von THIERFELDER angegebenen Zinkreagens aus äußeren Gründen unterbleiben mußte, und daß statt dessen die Umkristallisation in Chloroform-Methylalkohol häufiger wiederholt wurde. Zum Schluß war mit der Molybdänblaureaktion nach dem Veraschen nur noch eine Spur Phosphor nachweisbar. Aus dieser letzten Verunreinigung erklärt sich auch der Fehler von zirka 2%. Vielfache Wiederholungen, die mit anderen Mengen angestellt wurden, ergaben immer den gleichen Fehler.

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor SCHMITZ für die Anregung zu der Arbeit und die freundliche Unterstützung bei ihrer Ausführung herzlichst danken. Auch der Notgemeinschaft deutscher Wissenschaft, mit deren Hilfe die Arbeit durchgeführt wurde, sage ich an dieser Stelle meinen besten Dank.

Die Bedeutung der Methoden der botanischen Mikrotechnik für die pflanzliche Mikrochemie und Histochemie.

Von **Josef Kisser.**

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingelangt am 19. Juni 1929.)

Durch die grundlegenden Arbeiten von PREGL, EMICH, BEHRENS, DONAU u. a. hat in den letzten Dezennien die Mikrochemie in qualitativer und quantitativer Hinsicht einen derartigen Aufschwung genommen, daß sich die verschiedensten Disziplinen diese Erfolge für ihre Gebiete zunutze gemacht haben. Daß dabei die einzelnen Disziplinen, die sich bei ihren Untersuchungen mikrochemischer Methoden bedienen, die Methodik der „reinen" Chemie oft nicht glatt übernehmen können, sondern sie erst für ihre Zwecke zurichten und der gegebenen Materie anpassen müssen, ist wohl klar und selbstverständlich. Auf diese Weise erhielt aber der Begriff der Mikrochemie etwas Unbestimmtes und er wird daher von verschiedener Seite auch in verschiedenem Sinne gebraucht, worauf schon TUNMANN[1]) im Vorworte zu seinem Buche hinweist. Diese Unbestimmtheit des Begriffes hat sich aber auch auf einem engen Gebiete bereits bemerkbar gemacht, auf dem Gebiete, das sich mit der mikrochemischen Untersuchung der Pflanzen beschäftigt, wo die Begriffe „Pflanzenhistochemie" und „Pflanzenmikrochemie" bald im gleichen Sinne gebraucht werden, bald die Histochemie als ein spezieller Teil der Pflanzenmikrochemie hingestellt wird. Durch eine präzise Terminierung hier Klarheit zu schaffen, insbesondere den Begriff der pflanzlichen Histochemie scharf zu umschreiben und abzugrenzen, schien mir vor allem notwendig, bevor auf die mikrotechnischen Methoden, welche in den Dienst der pflanzlichen Mikrochemie treten können, näher eingegangen wird.

TUNMANN[1]) bezeichnet, um Mißverständnisse auszuschließen, das Gebiet, das sich nur mit pflanzlichen Objekten beschäftigt, als „botanische Mikrochemie", „Phytomikrochemie" oder als „Pflanzenmikrochemie" und wählt letztere Bezeichnung auch als Titel für sein Buch. Aus denselben Erkenntnissen heraus hat

[1]) TUNMANN O., Pflanzenmikrochemie, Berlin 1913.

Molisch[2]), unabhängig von Tunmann, sein Buch als „Mikrochemie der Pflanze" bezeichnet. Was nun die engere Abgrenzung des Begriffes der „Pflanzenmikrochemie" anlangt, so wollen wir zuerst den Ausführungen Tunmann's folgen: „Wir wählen die Bezeichnung Pflanzenmikrochemie, da sich seit langem die Ausdrücke Pflanzenanatomie, Pflanzenphysiologie u. a. eingebürgert haben und weil sich eine Trennung des großen Gebietes in eine reine und in eine angewandte Pflanzenmikrochemie anbahnt. Das vornehmste Ziel der reinen Pflanzenmikrochemie liegt in dem Nachweis der Körper in der Zelle selbst und im Gewebe sowie in der eingehenden Charakteristik der Zellwände und der organisierten Bestandteile der Zelle. Hauptaufgabe der angewandten Pflanzenmikrochemie ist der tunlichst unmittelbar mit den pflanzlichen Objekten am Objektträger ausgeführte Nachweise der Pflanzenstoffe bei möglichst geringem Aufwand an Zeit und Material." Trotzdem scheint es in machen Fällen Schwierigkeiten zu bereiten, die Pflanzenmikrochemie gegen die reine Mikrochemie abzugrenzen und diese Schwierigkeiten hat auch Tunmann empfunden, wenn er sagt: „Die Grenze zwischen Pflanzenmikrochemie und reiner Mikrochemie kann nicht scharf gezogen werden, gegenwärtig, da die letztere sich noch vorwiegend mit anorganischen Körpern beschäftigt, vielleicht noch leichter als in Zukunft. Im allgemeinen aber kann man sagen, daß alle Arbeiten, die sich direkt mit den pflanzlichen Objekten, und zwar in einfacher Weise am Objektträger ausführen lassen, in unser Gebiet fallen. Daraus geht hervor, daß Arbeiten, die von schwieriger herzustellenden Zubereitungen (Auszügen, gereinigten Lösungen) ausgehen, uns schon ferner liegen. Doch, es sei nochmals betont, diese Abgrenzung ist nicht scharf. Neigungen und Fähigkeiten des Einzelnen werden die Grenze bald nach der chemischen, bald nach der physikalischen, speziell kristallographischen Seite verschieben." Vorstehenden Ausführungen zufolge ist mit dem Begriffe der Pflanzenmikrochemie die Ausführung der Reaktionen direkt mit dem pflanzlichen Objekt innigst verknüpft. Eine Vertiefung der Reaktionen nach der chemischen, physikalischen und kristallographischen Seite wird jedoch die Grenzen der Pflanzenmikrochemie kaum verwischen, vielmehr eine wertvolle Erweiterung und Verfeinerung für sie mit sich bringen. Das kann für die Pflanzen-

[2]) Molisch H., Mikrochemie der Pflanze, 3. Aufl., Jena 1924.

mikrochemie nur von Vorteil sein. In gewissen Fällen hat es nun tatsächlich den Anschein, als ob die Grenze zwischen reiner Mikrochemie und Pflanzenmikrochemie eine sehr unscharfe wäre. Dies ist z. B. bei den Sublimationsmethoden der Fall, einer an und für sich rein chemischen Manipulation; und trotzdem würde wohl niemand die Sublimationsmethoden als nicht zur Methodik der Pflanzenmikrochemie gehörig ansehen, wo sie doch den Nachweis gewisser Stoffe aus einem Schnitt oder einem Pflanzenfragment gestatten.

Diese Unsicherheit, wo hört die Pflanzenmikrochemie auf und wo fängt die reine Mikrochemie an, ist nur der Ausdruck einer fehlenden präzisen Abgrenzung des Begriffes der Pflanzenmikrochemie. Diese soll im folgenden nun vorgenommen werden. Die sich bei pflanzenmikrochemischen Untersuchungen nur angenehm bemerkbare Zeitökonomie ist k e i n e Besonderheit der Pflanzenmikrochemie, sondern vielfach Gemeingut a l l e r mikrochemischen Reaktionen. Auch der Umstand, daß das Reaktionsprodukt mit Hilfe des Mikroskopes kontrolliert und untersucht wird und daß viele Reaktionen direkt unter dem Mikroskope vorgenommen und verfolgt werden können, gilt für alle Zweige der Mikrochemie, desgleichen auch, daß die Reaktionen vielfach auf Objektträgern oder auf ähnlichen Unterlagen ausgeführt werden. Dadurch wird nur die mikroskopische Untersuchung und Kontrolle ermöglicht. Die Pflanzenmikrochemie kann also nur durch solche Momente charakterisiert werden, welche d i r e k t mit der Pflanze zusammenhängen und die sich folgendermaßen zusammenfassen lassen:

1. Die mikrochemischen Reaktionen müssen direkt an oder mit dem pflanzlichen Material vorgenommen werden.

2. Zur Ausführung der Reaktion genügt ein kleines Stück von pflanzlichem Gewebe, in den Ausmaßen, wie es sonst zur mikroskopischen Untersuchung verwendet wird. Dabei ist es gleichgültig, ob das Material als Schnitt, Mazerat, Pulver oder in sonst einer Form vorliegt. Die Mengenverhältnisse werden sich am besten in der Art umschreiben lassen, daß die Menge derart ist, daß die Reaktion bequem auf dem Objektträger vorgenommen und das Material bequem von einem Deckglas bedeckt werden kann.

3. Die Reaktionen mit Auszügen, Preßsäften oder dergleichen gehören nur dann in den Bereich der Pflanzenmikrochemie, wenn sie ohne komplizierte Methodik aus kleinen Gewebsfragmenten auf dem Objektträger hergestellt und gewonnen werden können. Bei

der Untersuchung und Prüfung von Pflanzenaschen kann nur dann von pflanzenmikrochemischer Untersuchung gesprochen werden, wenn nur solche Mengen von Asche verwendet werden, wie dies sonst zur mikroskopischen Untersuchung geschieht.

4. Die ganze Art der Ausführung und der Methodik der Pflanzenmikrochemie bringt es mit sich, daß die hierher gehörenden Reaktionen nur qualitativer Natur sein können. In quantitativer Hinsicht kann das Vorhandensein oder Fehlen eines Stoffes festgestellt werden, ferner können auch bis zu einem gewissen Grade die relativen Mengenverhältnisse abgeschätzt werden. Nur bei Sublimationen ist unter gewissen Voraussetzungen eine genaue Erfassung der Menge der sublimierten Substanz durch Wägung möglich.

Die hier vorgenommene Abgrenzung des Begriffes der Pflanzenmikrochemie ist derart, daß sie Unklarheiten nicht mehr zuläßt. Vor allem zeigt sie klar und deutlich, daß nicht jedes chemische Arbeiten mit Pflanzenmaterial, auch wenn man sich dabei gewisser Mikromethoden bedient, Pflanzenmikrochemie ist. Die Reindarstellung, Untersuchung und Analyse irgendeines Pflanzenkörpers mit Hilfe von Mikromethoden hat mit Pflanzenmikrochemie nichts zu tun. Die einzige Beziehung zur Pflanze bei dieser rein chemischen Arbeit ist die, daß ein Pflanzenprodukt vorliegt, das aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und gewonnen werden muß. Die biochemische Forschung, deren Aufgabe es ist, die chemischen Vorgänge im lebenden Organismus in qualitativer und quantitativer Hinsicht zu erfassen, bedient sich im allgemeinen der üblichen chemischen Methoden. Die spezielle Fragestellung und die Arbeit mit biologischem Material überhaupt erheischt jedoch in vielen Fällen eine besondere Zurichtung und Anpassung der einzelnen Methoden. Daß sich auch die Biochemie im weitestgehenden Maße der mikrochemischen Methoden bedient, ist naheliegend und selbstverständlich, um so mehr, als in den weitaus meisten Fällen nur mit sehr geringen Stoffausbeuten zu rechnen ist. Die pflanzliche Mikro-Biochemie ist aber nicht dasselbe wie Pflanzenmikrochemie, wenn auch in gewissen Fällen die Pflanzenmikrochemie der pflanzlichen Mikro-Biochemie unterzuordnen ist und ein Teilgebiet von ihr darstellt. Die Gesamtheit der mikrochemischen Methoden, die bei der Pflanzenuntersuchung im weitesten Sinne Verwendung finden, lassen sich als die große Gruppe der mikrochemischen

Methoden zur Erforschung des Chemismus und der chemischen Leistungen des Pflanzenorganismus zusammenfassen.

Schon TUNMANN hat das große Gebiet der Pflanzenmikrochemie in eine reine und in eine angewandte Pflanzenmikrochemie geteilt. Während es Aufgabe der angewandten Pflanzenmikrochemie ist, allgemein den Nachweis eines Stoffes zu führen und dessen Vorhandensein oder Fehlen aufzuzeigen, was für diagnostische Zwecke, für systematisch-anatomische Studien und für die Entscheidung gewisser biochemischer Fragen von großem Vorteil ist, gilt es als oberstes und vornehmstes Ziel der reinen Pflanzenmikrochemie, den Nachweis der einzelnen Stoffe so zu führen, daß sie an der Stelle angezeigt werden, wo sie in der lebenden Pflanze auch lokalisiert sind. Die reine Pflanzenmikrochemie begnügt sich demnach nicht mit dem Nachweis von Stoffen im Pflanzengewebe an und für sich, sondern hat deren lokalisierten Nachweis zum Ziele und wird dadurch unter anderem auch für anatomische und anatomisch-physiologische Zwecke wertvoll. An Stelle der Bezeichnung *„reine Pflanzenmikrochemie"* wird auch die Bezeichnung *„pflanzliche Histochemie"* gebraucht und wir wollen uns im folgenden auch stets dieser Bezeichnung bedienen.

Ein großer Teil der gegenwärtig der Histochemie zur Verfügung stehenden Reaktionen entspricht keineswegs den Anforderungen, die bezüglich eines lokalisierten Nachweises an sie gestellt werden müssen. Die Ursachen hierfür sind mannigfacher Natur, wie geringe Empfindlichkeit der Reaktionen, langsamer Eintritt der Reaktion und damit Gefahr einer Translokation der Stoffe und dergleichen. Es bedarf daher die Histochemie noch einer sehr weitgehenden Ausgestaltung, die sich einerseits auf die Durcharbeitung der bestehenden und die Schaffung von neuen Reaktionen erstrecken wird, anderseits wird auch in methodischer Hinsicht manches Neue zu schaffen sein und es werden die Methoden und Erfahrungen der verschiedensten Zweige der Mikrotechnik in einem weiteren Maße als bisher in den Dienst der Histochemie treten müssen. Da wir heute noch weit davon entfernt sind, den Nachweis der einzelnen Stoffe absolut lokalisiert führen zu können, anderseits ein absolut lokalisierter Nachweis nicht in allen Fällen unbedingte Notwendigkeit ist, so werden wir bei unseren histo-

chemischen Reaktionen im allgemeinen drei Arten von Lokalisierungen unterscheiden müssen. Demnach kann der Nachweis sein:

1. gewebslokalisiert,
2. zellokalisiert,
3. absolut lokalisiert.

Der ideale Nachweis ist entschieden der absolut lokalisierte, wo die Stoffe innerhalb der Zelle am Orte ihres Vorhandenseins angezeigt werden. Über solche Nachweismöglichkeiten verfügt die Histochemie nur in beschränktem Maße. Die meisten von ihnen stellen Farbenreaktionen dar und betreffen den Nachweis mehr oder minder fester Bestandteile der Zellwand (Holz, Zellulose, Pektin, Kutin, Suberin) oder gewisser fester Zellinhaltsstoffe (z. B. Stärke, Kristalle u. a.), in seltenen Fällen zähflüssiger oder flüssiger Zellbestandteile. Einfacher liegen die Verhältnisse schon bei dem zellokalisierten Nachweis. Hier zeigen uns die Reaktionen an, in welchen Zellen ein bestimmter Stoff vorkommt, ohne daß damit dessen nähere Lagerung oder Verteilung innerhalb der Zelle zum Ausdruck kommt. Dringen die Reagentien nur sehr langsam in das Zellinnere ein oder läßt der Ausfall einer Reaktion, nachdem durch das Reagens die Zellen getötet worden sind, sehr lange auf sich warten, so kann es während dieser Zeit zu stofflichen Verlagerungen und zu einem Herausdiffundieren der Stoffe aus den Zellen kommen. In diesen Fällen ist dann auch ein zellokalisierter Nachweis nicht mehr möglich und man kann auf Grund des Reaktionsausfalles höchstens feststellen, innerhalb welcher Gewebe oder Gewebsgruppen ein bestimmter Stoff vorkommt. Die Gewebslokalisierung kann dadurch erleichtert werden, daß man die zur Ausführung der Reaktion bestimmten Schnitte schon derart zurichtet, daß sie nur eine bestimmte Gewebeart enthalten.

Schließlich erscheint es noch notwendig, kurz die Frage zu streifen, was sich mit Hilfe der histochemischen Reaktionen erreichen läßt und welche Grenzen der Histochemie gesetzt sind. Wir können uns diesbezüglich an die Ausführungen von Brunswik[3]) halten, der in ungemein scharfsinniger Weise die Grenzen der Mikrochemie in der Biologie aufgezeigt hat. Was die Zellmikro-

[3]) Brunswik H., Die Grenzen der mikrochemischen Methodik in der Biologie. (Die Naturwissenschaften, Jahrg. 1923, S. 881 bis 885.)

chemie bisher erreicht hat, ist der Nachweis und die Lokalisationsermittlung von Reserve- und Gerüstsubstanzen, von Sekreten und Exkreten der Zelle sowie von Stoffwechselprodukten, die in reichlicher Menge auftreten und angehäuft werden. Trotz der enormen Empfindlichkeit gewisser Reaktionen ist die Histochemie aber nicht in der Lage, Stoffwechselfragen einer Klärung zuzuführen, da es dazu noch bedeutend empfindlicherer Reaktionen bedarf und über solche die Histochemie gegenwärtig nicht verfügt. Wenn sich auf histochemischem Wege trotzdem gelegentlich Stoffwandlungen in der Zelle oder in Geweben qualitativ erfassen lassen, so darf man dabei nie vergessen, daß es sich um einzelne besonders günstige Fälle handelt und daß dabei nur das Anfangs- und das Endglied der Reaktionskette erfaßt wird. In die dazwischen liegenden Vorgänge einzudringen, die Zwischen- und Übergangsprodukte nachweisen zu können, wird der Histochemie wie überhaupt der Pflanzenmikrochemie wohl durchweg versagt bleiben.

Daß die innigst mit dem Pflanzengewebe verknüpfte Histochemie ihre eigene, dem Substrat angepaßte Methodik braucht, ist selbstverständlich. Besonders werden aber in den Dienst der Histochemie und der Pflanzenmikrochemie überhaupt alle jene Methoden treten müssen, welche sonst zum Zwecke einer zytologischen oder histologischen Untersuchung uns die Möglichkeit geben, einen genaueren Einblick in den Feinbau der Zelle und der Gewebe zu gewinnen. Die Heranziehung dieser Methoden, der Methoden der Mikrotechnik, für histochemische Untersuchungen bringt viele und große Vorteile für die Histochemie mit sich und es sollen daher im folgenden die sich bietenden Möglichkeiten kurz skizziert werden, ohne daß an dieser Stelle auf die Handhabung der Methoden näher eingegangen wird. Das erübrigt sich um so mehr, als an anderer Stelle die einschlägige Methodik ausführlichst behandelt ist[4]). Welcher Methode man sich im einzelnen Falle bedienen wird, hängt ganz von der Natur des zu verarbeitenden Materials ab, ob es lebend oder tot, fixiert, konserviert oder trocken ist, weiters welcher Natur die Stoffe sind, die einer histochemischen Prüfung unterworfen werden sollen.

Die größte Bedeutung für die Histochemie besitzt das Mikrotom

[4]) Kisser J., Leitfaden der botanischen Mikrotechnik, Jena 1926; ferner: Der heutige Stand botanisch-mikrotechnischer Schneidemethoden. (Biologia generalis, Bd. 4, 1928, S. 131 bis 180.)

und die sich daran knüpfenden Schneidemethoden, welche heute einen derartigen Ausbau besitzen, daß sie die Zerlegung jedes Objektes in Schnitte von notwendigem Ausmaße und notwendiger Feinheit gestatten. Die Methodik wird sich danach richten müssen, ob lebendes oder totes, hartes oder weiches Material vorliegt. Wo besonders dünne Schnitte notwendig sind, wird man, falls dies unbeschadet der nachzuweisenden Stoffe geschehen kann, auch zu Einbettungen des Materials greifen, wobei sich die Auswahl der Einbettungsmasse wieder dem einzelnen Falle anpassen muß. Es stehen uns ja eine Reihe von verschiedenen Einbettungsmöglichkeiten zur Verfügung, solche, welche eine völlige Entwässerung des Materials beanspruchen (Paraffin, Zelloidin) und solche, bei denen das Material eine Entwässerung nicht durchmachen muß (Glycerin-Gelatine, Agar, Gummi) und es daher auch nicht mit verschiedenen organischen Solventien in Berührung zu kommen braucht. Sonst wird totes Material je nach seiner Konsistenz zur Erzielung entsprechender Schnitte verschieden behandelt werden müssen. Gut schneidbares kann direkt geschnitten werden, zu hartes muß erweicht, zu weiches gehärtet werden. Die Art der Härtung und Erweichung muß dabei wiederum auf die im Gewebe vorhandenen und nachzuweisenden Stoffe Rücksicht nehmen.

Besonders wichtig für histochemische Untersuchungen ist die Möglichkeit des direkten Schneidens von lebendem Material mit dem Mikrotom, wenn dies auch im allgemeinen nicht so einfach wie von totem und in seiner Konsistenz entsprechend beeinflußbarem Material ist. Um ein Austrocknen und damit ein Absterben des lebenden Materials beim Schneiden zu verhindern, muß es gut befeuchtet werden. Die Schwierigkeiten, die sich beim Befeuchten des Messers mit Wasser stets einstellten, indem sich dieses infolge seiner großen Oberflächenspannung nicht längs der Schneide auf dem Messer ausbreitete, konnten überwunden werden. Geringe Zusätze von Gelatine, Eiweiß oder Seife zum Wasser setzen dessen Oberflächenspannung sehr stark herab und ermöglichen dadurch dessen leichtes Ausbreiten längs der Messerschneide. Eine andere Schwierigkeit, kleine und weiche lebende Objekte ohne Beschädigung in die Objektklammer am Mikrotom einzuspannen, kann dadurch überwunden werden, daß das Material mit Paraffin umschlossen wird.

Die Schnitte von toten Materialien werden im allgemeinen nur für gewisse histochemische Untersuchung dienen können und ge-

eignet sein, während sie für pflanzenmikrochemische Untersuchungen im weitesten Sinne in viel ausgedehnterem Maße Verwendung finden können, wo es sich eben nur um den Stoffnachweis als solchen ohne Rücksicht auf die Lokalisierung handelt. Denn im getrockneten Material werden beim Trocknen die gelösten Inhaltsstoffe weitgehend verlagert, beim konservierten oder fixierten werden viele herausgelöst oder verändert. Hingegen lassen sich alle festen Bestandteile, wie die Gerüstsubstanzen, die festen Inhaltskörper und Kristalle, an solchem Material gut untersuchen. Für Membranstudien ist totes Material sogar vielfach unbedingt notwendig, da nur solches entsprechend vorbehandelt, gehärtet oder eingebettet werden kann und so die Anfertigung dünnster Schnitte gestattet. Werden doch für Untersuchungen über die Feinstruktur der Membranen oft Schnitte von nur wenigen μ Dicke benötigt.

Von lebendem Material lassen sich oft infolge der weniger günstigen Schneidekonsistenz nicht so dünne Schnitte wie von totem erhalten, doch sind so dünne Schnitte gar nicht notwendig, ja vielfach nicht einmal erwünscht und nur nachteilig. Werden von lebenden Geweben allzu dünne Schnitte hergestellt, so werden dabei die meisten Zellen angeschnitten, teilweise zerstört und aus den angeschnittenen Zellen können nun die löslichen Stoffe heraustreten und sich über die ganze Schnittfläche verteilen. Ein lokalisierter Nachweis ist unter solchen Umständen dann nur schwer zu führen. Es muß daher die Schnittdicke so bemessen werden, daß sie auf die Größe der Zellen Rücksicht nimmt und der Schnitt mindestens eine Lage von intakten Zellen enthält. Auf diesen Umstand wird bei der Ausführung von histochemischen Reaktionen nicht immer das notwendige Gewicht gelegt, insbesondere nicht bei der Anfertigung von Querschnitten durch Stengelorgane. Da nämlich die Zellen in den meisten Stengelorganen in der Längsrichtung sehr stark gestreckt sind, müssen relativ dicke Schnitte angefertigt werden, um nicht die meisten Zellen zu verletzen. Da dicke Schnitte die Beobachtung aber erschweren, so ist in vielen Fällen die Anfertigung von Längsschnitten vorzuziehen, da die Zellen in der Breite einen viel geringeren Durchmesser besitzen, oder man greift zur Anfertigung von Gefrierschnitten, worauf wir später noch zurückkommen werden. Bei jeder Anfertigung von Schnitten werden eine große Zahl von Zellen angeschnitten und verletzt. Um sich von den aus diesen herausgetretenen Stoffen unabhängig zu machen, wird es manchmal notwendig sein, die

Schnitte in fließendem Wasser gut zu waschen, um den Inhalt der angeschnittenen Zellen zu entfernen. Restlos wird dies aber wohl nicht immer gelingen.

In den Fällen, wo zell- und gewebslokalisierte Nachweise notwendig sind, kann auch die Gefriermethode wertvolle Dienste leisten. Bei dieser Methode wird das lebende Material auf dem Mikrotom durchgefroren, im gefrorenen Zustande geschnitten und die gefrorenen Schnitte können dann direkt in das Reagens übertragen werden. Da die Zellen durch das Gefrieren getötet werden, werden auch viele Reagentien bei solchen Schnitten in die Zellen viel leichter eindringen können. Die Verwendung der Gefriermethode für histochemische Zwecke geht auf MACALLUM[5]) zurück, der sie bei tierischen Objekten verwendete und meines Wissens waren STOKLASA und MATOUSEK[6]) die ersten, die sich ihrer auch bei pflanzlichen Objekten bedienten. Bei der Anfertigung von Gefrierschnitten für histochemische Zwecke ist es nur notwendig, daß die Schnitte am Messer gefroren bleiben. Die Messer müssen daher stark gekühlt werden, was am besten nach dem von KRAUSE[7]) vorgeschlagenen Verfahren geschieht. Die Schnitte kommen gefroren in das Reagens, so daß eine stoffliche Verlagerung weder vor der Schnittanfertigung noch im Schnitte selbst möglich ist. Eventuell doch auftretende Veränderungen sind so geringfügig, daß sie kaum ins Gewicht fallen. Voraussetzung ist aber, daß die Reaktion rasch eintritt, da bei trägen Reaktionen und langsamem Auftreten des Reaktionsproduktes mit Verlagerungen zu rechnen ist.

Die hier kurz skizzierten Möglichkeiten der Anfertigung von Schnitten mit dem Mikrotom zeigen klar und deutlich, in wie vielen Fällen dieser Zweig der botanischen Mikrotechnik mit Erfolg in den Dienst der Histochemie treten kann, und es wird Aufgabe künftiger Untersuchungen sein, dieses Gebiet noch weiter zu vertiefen. Es braucht nicht besonders darauf hingewiesen werden, daß die botanische Mikrotechnik ebenso auch für die allge-

---

[5]) MACALLUM A. B., Die Methoden der biochemischen Mikrochemie. (Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, herausg. von ABDERHALDEN E., Bd. 5, 1911, Berlin-Wien.)

[6]) STOKLASA J. und MATOUSEK A., Beiträge zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe, Jena 1916, S. 28.

[7]) KRAUSE R., Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, 3. Aufl., Bd. II 1926

meine pflanzliche Mikrochemie bedeutungsvoll ist. In kurzen Zügen mögen im nachstehenden die Vorteile des Mikrotoms und der Mikrotomtechnik für die Histochemie und für die Pflanzenmikrochemie überhaupt zusammengefaßt werden.

1. Die Möglichkeit der Anfertigung zahlreicher Schnitte in kürzester Zeit, durch lebende wie durch tote Objekte, gestattet, viele Reaktionen in Parallele nebeneinander ausführen zu können. Nur so läßt sich ein erschöpfendes Bild gewinnen und nur so ist es möglich, eine Reaktion gründlich auf ihren Wert und ihre Brauchbarkeit studieren zu können.

2. Durch die Möglichkeit der Herstellung von Schnitten beliebiger, aber genau meßbarer Dicke kann die Schnittdicke stets der Struktur der einzelnen Gewebe angepaßt werden.

3. Da die Schnitte auch sämtliche eine gleichmäßige Dicke besitzen und große Schnittmengen von gewünschter Dicke in gleichem Maße hergestellt werden können, lassen sich leicht Vergleiche über die Mengenverhältnisse bestimmter Stoffe in den verschiedenen Geweben und Organen bei denselben Pflanzen und bei verschiedenen Pflanzen gewinnen.

4. Der Umstand, daß auch Schnitte von großen Dimensionen angefertigt werden können, ermöglicht an jedem Schnitt den sofortigen Überblick über die Stoffverteilung in gleichartigen und verschiedenen Geweben.

5. Beim Nachweis flüchtiger Verbindungen muß Schnittanfertigung und Reaktion ungemein rasch aufeinander folgen. Auch hier leistet das Mikrotom überaus wertvolle Dienste und ermöglichte Peche[8]) den Nachweis der ungemein flüchtigen Zyanwasserstoffsäure in den Blättern von *Prunus Laurocerasus* L.

6. Schließlich sei hier noch auf eine von mir[9]) mit Hilfe des Mikrotoms ausgearbeitete Methode hingewiesen, welche es gestattet, die Empfindlichkeitsgrenzen bei solchen mikrochemischen Reaktionen zu ermitteln, wo als Reagentien alkoholische Lösungen verwendet werden. Falls das Reaktionsprodukt in Alkohol weniger löslich als in Wasser ist, empfiehlt es sich, falls dies aus

[8]) Peche K., Mikrochemischer Nachweis der Zyanwasserstoffsäure in Prunus Laurocerasus L. (Sitzber. Kais. Akad. Wiss. Wien, mathem.-naturwiss. Kl., Abt. I, Bd. 121, 1912.)

[9]) Kisser J., Beitrag zum histochemischen Nachweis des Kalziums. (Pharmazeutische Presse, Folge 4, 1923.)

sonstigen Gründen angängig ist, in Alkohol gelöste Reagentien zu verwenden, die auch gleichzeitig rascher und leichter in die Zellen eindringen. Da nun zu prüfende wässerige Lösungstropfen durch alkoholische Reagentien auf dem Objektträger verdrängt werden und es zu keiner innigen Mischung beider kommt, so kann man vorteilhaft folgendermaßen verfahren: Mit dem Mikrotom werden etwa 100 μ dicke Querschnitte durch Hollundermark hergestellt, von der Luft befreit, dann chemisch gereinigt und schließlich mit der zu prüfenden Lösung durchtränkt. Zu solchen Schnitten kann nun ein alkoholisches Reagens, ohne daß man Unzukömmlichkeiten befürchten muß, zugesetzt werden. Man erhält bei derartiger Ausführung der Reaktion gleichzeitig auch ein annäherndes Bild über die Form und die Größe, die Kristalle im Gewebe annehmen.

Nicht nur die Schneidemethoden, auch die übrigen Methoden der Mikrotechnik können mit Erfolg in den Dienst der pflanzlichen Mikrochemie und Histochemie treten und es eröffnet sich auch hier ein weites Gebiet für künftige Untersuchungen.

Manche Reagentien wirken derart energisch auf pflanzliche Gewebe ein, daß sie zum Verquellen gebracht oder ganz zerstört werden. Von einem lokalisierten Nachweis kann dann natürlich nicht mehr die Rede sein. Hier hat nun KRETZ[10]) einen Weg gewiesen, der über derartige Schwierigkeiten hinwegführen kann. Beim Nachweis des Tryptophans in pflanzlichen Geweben mittels der VOISENET'schen Reaktion stellten sich insofern große Schwierigkeiten ein, als durch die notwendige Verwendung von konzentrierter Salzsäure ein rasches Diffundieren des gebildeten Farbstoffes eintrat, anderseits das Gewebe derart verquoll und erweicht wurde, daß es beim Auflegen des Deckglases zum Zweck der mikroskopischen Untersuchung zu einem strukturlosen Brei zerfloß. Über diese Schwierigkeit konnte aber KRETZ dadurch hinwegkommen, daß er die Gewebe durch ein künstliches Kieselsäureskelett widerstandsfähig machte. Die Schnitte werden zuerst kurz in eine wässerige Lösung von Natriumsilikat übertragen, worauf beim Übertragen in das Reagens durch die in ihm vorhandene Salzsäure die Kieselsäure in Freiheit gesetzt wird und als chemisch äußerst schwer angreifbares Gel ausfällt. Dieses Verfahren ermöglichte eine Verfestigung des Gewebes und gleichzeitig den lokali-

[10]) KRETZ FR., Über den mikrochemischen Nachweis von Tryptophan in der Pflanze. (Biochem. Zeitschr., Bd. 130, 1922, S. 86 bis 98.)

sierten Nachweis des Tryptophans. In Verbindung mit einer Fixierung der Eiweißsubstanzen ließen sich selbst zytologische Details in der hochkonzentrierten Salzsäure untersuchen. Dieses Verfahren oder auf ähnlichen Prinzipien aufgebaute andere werden vielleicht zur Verfeinerung mancher Reaktionen beitragen können. Insbesondere ist auch daran zu denken, ob sich nicht gerade bei sehr empfindlichen Farbenreaktionen, die diffus sind und durch das Herausdiffundieren des Reaktionsproduktes an Brauchbarkeit für histochemische Untersuchungen verlieren, durch gewisse kolloidale Zusätze bedeutende Verbesserungen erzielen lassen, falls es dadurch gelingt, dem Herausdiffundieren entgegenzuwirken.

Eine anders geartete Verfestigung erweist sich auch manchmal bei Pflanzenaschen als notwendig. Durch Veraschung von pflanzlichen Schnitten oder Gewebstücken[11]) lassen sich leicht Anhaltspunkte bezüglich Menge und Verteilung der Mineralbestandteile gewinnen, insbesondere der Verkieselungen, die mit ihren feinsten Details und Strukturen in der Asche sehr klar und deutlich hervortreten. Gewebe, die in ihren Membranen nur sehr geringe Mengen von Mineralsubstanzen enthalten, liefern nach dem Verbrennen Aschen, die äußerst wenig widerstandsfähig sind und die bei noch so sorgsamer Verarbeitung zu einem Präparate gänzlich zerfallen. Dem kann dadurch abgeholfen werden, daß man nach einem auf meine Veranlassung vor kurzem von BLABENSTEINER[12]) ausgearbeiteten Verfahren die Asche auf bestimmte Art mit Zelloidin durchtränkt und sie so ungemein verfestigt und widerstandsfähig macht.

Was die übrigen Verfahren der Mikrotechnik anlangt, so sei hier kurz noch auf die Mazerationsmethoden hingewiesen, die bei der Untersuchung von Membransubstanzen gute Dienste leisten können[13]), ferner auf die verschiedenen Aufhellungsmittel, die je

[11]) Vergl. diesbezüglich die Literaturzusammenstellung bei KISSER J., Der heutige Stand botanisch-mikrotechnischer Schneidemethoden (Biologia generalis, Bd. 4, 1928, S. 131 bis 180); ferner sei hier auf eine umfassende Darstellung dieses Gebietes hingewiesen, die in nächster Zeit im Rahmen des ABDERHALDEN'schen Handbuches der biologischen Arbeitsmethoden erscheinen wird.

[12]) BLABENSTEINER W., Über die Verwendung des Aschenbildes für die Bestimmung pharmakognostisch benützter Rinden. (Sitzber. Akad. Wiss. Wien, mathem.-naturwiss. Kl., Abt. I, 1928.)

[13]) Vergl. z. B. ANDERSON D. B., Über die Struktur der Kollenchymzellwand auf Grund mikrochemischer Untersuchungen. (Sitzber. Akad. Wiss. Wien, mathem.-naturwiss. Kl., Abt. I, Bd. 136, 1927.)

nach ihrer Wirkung physikalischer oder chemischer Natur sein können, vielfach aber eine scharfe Abgrenzung nicht zulassen. Durch Bleichung der Gewebe oder durch Verwendung stark lichtbrechender Medien als Untersuchungsflüssigkeit können nicht nur bereits im Gewebe vorhandene Stoffe deutlicher hervorgehoben werden, sondern nach Ausführung von Reaktionen auch oft gewisse Reaktionsprodukte. Es sei hier nur auf das Phenol zum Nachweis von Verkieselungen hingewiesen, das Jodphenol und das Jodchloralhydrat zum Nachweis kleinster Stärkemengen und dergleichen mehr.

Die vorstehenden, zum Teil allgemein gehaltenen Ausführungen und die speziell herausgegriffenen Beispiele haben vor allem den Zweck verfolgt, aufzuzeigen, daß die Grenzen der pflanzlichen Mikrochemie und im speziellen der pflanzlichen Histochemie scharf gezogen werden können, was für einen weiteren Ausbau dieser großen und wichtigen Gebiete von Nutzen und Vorteil sein wird. Sie haben weiters gezeigt, daß dieselben Methoden, die uns bei zytologischen und histologischen Untersuchungen einen genauen Einblick in den mikroskopischen Aufbau der Zelle und Gewebe ermöglichen, auch in den Dienst der pflanzlichen Mikrochemie und Histochemie treten können und daß sie berufen sind, wesentlich zur Verfeinerung und Vertiefung der Pflanzenmikrochemie und besonders der Histochemie beizutragen.

Ein bewährter Mikroschmelzpunktsapparat.

Von **Gustav Klein.**

Vorstand des pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien.

(Eingelangt am 21. Juni 1929.)

Schon wiederholt wurden Apparate konstruiert, die eine Schmelzpunktsbestimmung kleinster Substanzmengen bei mikroskopischer Betrachtung ermöglichen sollten. So das Erhitzungsmikroskop von WEBER[1]) und von CRAM[2]). Die Apparate sind noch primitiv und müssen, wie angegeben, erst mit bekannten Substanzen geeicht werden, da die Thermometertemperaturen nicht mit den richtigen Schmelztemperaturen übereinstimmen.

Auch das SIEDENTOPF'sche[3]) Erhitzungsmikroskop wäre für Mikroschmelzpunktsbestimmungen geeignet, ebenso das LEHMANN'sche[4]) Ölbadmikroskop mit Gas- und elektrischer Heizung. Auch LOVITON[5]) soll einen heizbaren Objekttisch konstruiert haben. Eingebürgert hat sich keiner der genannten Apparate, über ihre Verwendbarkeit sind Urteile nicht zu finden.

In der neueren Literatur finde ich einen Apparat von FRIEDEL[6]). Er besteht „aus einer kleinen, zweiteiligen Kupferdose von 55 mm Durchmesser und 8 mm Höhe, in der oben und unten zwischen Glimmerplatten die Heizwicklungen angeordnet sind. Thermometer und Präparat befinden sich im selben Hohlraum und es können sogar Temperaturen von mehr als 200° bis auf 1° genau eingehalten werden. Wegen der Höhe der Dose sind nur Vergrößerungen bis 150fach verwendbar". Ferner einen Heiztisch für Mikroskope von ROBERTS[7]). „Von den drei Ausführungsformen hat die erste etwa folgende Ausbildung: Zwei aufeinandergelegte starke Messingplatten bilden durch Ausnehmungen zwischen sich eine rechteckige, flache Kammer. Die Platten haben auf den beiden Längsseiten der Kammer Bohrungen mit Zu- und Ableitungen für eine Kühlflüssigkeit und in der Mitte ein Rohr, um der Kammer ein Gas, z. B. Helium, zuführen zu können. Auf der dem Rohre gegenüberliegenden Seite des durch die Platten gebildeten Gehäuses des Heiztisches befindet sich eine flache, rechteckige, in die Kammer führende Öffnung zum Einschieben von zwei Glasplatten, die das Objekt einschließen. Die Führungen für die Objekträger werden von den Heizelektroden gebildet, die gegen das Gehäuse durch geglühte Glimmerplatten isoliert sind."

Soeben erschien eine Mitteilung von A. NIETHAMMER[8]), die sich, da unser Apparat[9a]) für sie firmenmäßig noch nicht erreichbar war, einen Heiztisch baute. Die Substanz wird in einem Quarznäpfchen, das von der isolierten Heizspirale umgeben ist, geschmolzen. Die Temperatur wurde mittels Thermoelement bestimmt. Als Widerstand wurden zwei Glühbirnen verwendet. Angaben über erprobte Substanzen und deren Schmelzpunkte werden nicht gegeben.

Bei meinen histochemischen Arbeiten sowohl wie besonders bei der Aufarbeitung der geringen Substanzmengen im physiologischen Abfangversuch wurde das Bedürfnis immer drängender, für kleinste Substanzmengen, ja wenige mikroskopisch kleine Kriställchen die in der Chemie so grundlegend gewordene physikalische Konstante des Schmelzpunktes eindeutig zu bestimmen. Aus diesem Bedürfnis, und da eine bewährte Apparatur dieser Art nicht existierte, versuchte ich zusammen mit den optischen Werken C. Reichert (Wien) einen auf das Mikroskop adaptierbaren Schmelzpunktsapparat, der möglichst das ganze Schmelzpunktsbereich der organischen Stoffe umfaßt, zu bauen.

Als praktische, reinliche Heizquelle kam nur eine elektrische Heizspirale in Betracht, zur Temperaturablesung thermometrische und thermoelektrische.

Wiewohl sich letztere Methode bei Verwendung von Kupfer-Konstantan-Elementen recht bewährte, kamen wir aus Gründen der Kompliziertheit und bedeutenden Verteuerung des Apparates, der einfach und allgemein benützt werden sollte, ab.

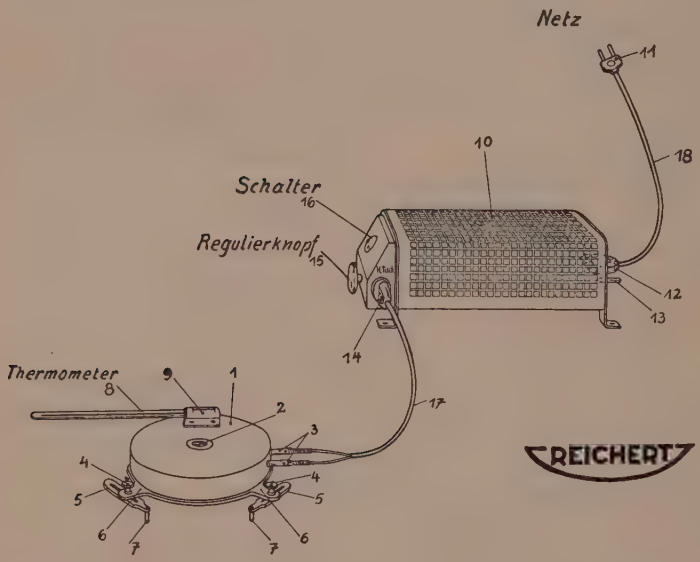
Die thermometrische Eichung, das heißt die nötige Temperaturgleichheit der Objektträgerstelle, auf der die Kriställchen der zu schmelzenden Substanz liegen, und der Thermometerkugel machte uns lange schier unüberwindliche Schwierigkeiten. Alle Versuche in geschlossener Asbestkapsel mit Fenster unten und oben, in dem Substanz und Thermometer nebeneinander angebracht, im gleichen Luftraum angeheizt wurden, gingen fehl, da die Differenzen von 30 bis 40° nicht zu überwinden waren.

Schließlich führte die scheinbar unsichere Methode, Objekt und Thermometer außen auf die Heizkammer zu verlegen, nach empirischem Probieren zum vollen Erfolg.

Der Apparat hat im Laufe der Jahre manche Änderungen erfahren, wurde inzwischen mehrfach kurz publiziert[9b]), [9c]) und vielseitig angewendet[10a]), gelangt aber erst jetzt, nachdem er durch fünf Jahre von mir und meiner Schule erprobt und serienweise herstellbar und eichbar ist, zur endgültigen Publikation.

Der Apparat (siehe Abb.) stellt eine heizbare Metallkapsel dar, die auf jedes beliebige Mikroskop mit Hilfe zweier, verstellbarer Klammern an Stelle eines Kreuztisches, bezw. an Stelle der gewöhnlichen Objektklammern zu montieren ist, und hat die Größe

eines normalen Mikroskoptisches. Um eine Erhitzung des Mikroskoptisches und damit des ganzen Mikroskopes möglichst herabzumindern, liegt der Apparat nicht direkt auf, sondern steht auf drei Asbestfüßchen frei über der Platte. Auf einer metallenen Grundplatte, die durch eine Asbestplatte gegen Wärmeausstrahlung nach unten geschützt ist, ist zentral ein durch die Heizkammer greifender Metallzylinder montiert, ein offener Schacht, der in der Ebene



der Heizplatte durch ein Linsensystem abgeschlossen wird, das an Stelle des Beleuchtungsapparates des Mikroskopes als Kondensor die Beleuchtung des Gesichtsfeldes besorgt. In der Kapsel ist am Metallzylinder die Heizspirale mit Glimmerplatten so befestigt, daß sie, frei in der Heizkammer ausgespannt, bis fast den Kapselrand berührend, durch Strahlung und Luftheizung die Objektfläche gleichmäßig erwärmt. Durch zwei Steckkontakte, die seitlich an der Kapsel angebracht sind, ist die Heizspirale über den Regulierwiderstand am Lichtnetz anzuschalten. Die obere Fläche ist als Objekttisch ausgebildet, besteht aus glatt poliertem Metall und trägt in ihrer Mitte den Kondensor, dessen Frontlinse in

der Ebene der Tischfläche liegt. Am oberen Rande der Tischfläche ist durch drei kleine Schrauben eine Metallhülse befestigt, in die das Thermometer so weit hineingeschoben wird, daß die Kugel völlig darin verschwindet, was durch einen am Thermometer eingeritzten Ring gekennzeichnet ist. Die Hülse ist so eng, daß das Thermometer genau hineinpaßt und überdies noch durch zwei federnde Teile der Hülse festgehalten wird. Dieser Anordnung gemäß zeigt also das Thermometer jene Temperatur an, die in der Hülse herrscht. Die Hülse liegt nun, und gerade das mußte empirisch erprobt werden, so gegen die Heizspirale, daß sie immer auf etwas höhere Temperatur gehalten wird als der Glaskondensor in der Mitte des Apparates, dessen Temperatur die des Gesichtsfeldes und also die des zu schmelzenden Objektes ist, die eben am Thermometer abgelesen werden soll. Um diese Differenz zwischen Gesichtsfeldtemperatur und Thermometertemperatur auszugleichen, werden zwischen den Objekttisch und die Thermometerhülse eine bestimmte Anzahl von Metallplättchen zwischengeschaltet, deren Dicke und Zahl für jeden Apparat verschieden ist und eichungsmäßig festgestellt wird. Je nach der Stärke der Plättchen (und je nach ihrer Zahl) setzt jedes von ihnen die Temperatur der Thermometerhülse um 2 bis $^1/_4{}^0$ herab. Es werden nun so viele derartige Plättchen zwischengeschaltet, daß das Thermometer immer dieselbe Temperatur anzeigt, die im gleichen Augenblick auch das Kondensorsystem, bezw. der Objektträger innehat. Auch dies wird eichungsmäßig festgestellt, und zwar so, daß eine Reihe von Substanzen mit eindeutig festgelegten und scharfen Schmelzpunkten geschmolzen wurden und das Thermometer mit Hilfe der Blechplättchen ebensolange verändert wird, bis es beim Schmelzen der bestimmten Substanzen die betreffenden Schmelztemperaturen anzeigt.

Der Widerstand, der dem Apparat vorgeschaltet ist, ist ein Heizdrahtwiderstand und besteht aus einem fixen, unveränderlichen Teil, der für Netzspannungen von 220, 150 und 100 Volt ganz oder teilweise eingeschaltet werden kann, indem der Steckkontakt der Lichtleitung an die für die betreffende Spannung am Apparat bezeichneten Kontakte angeschaltet wird. Vor diesem unveränderlichen Teil des Widerstandes ist noch ein zweiter veränderlicher Widerstand angebracht. Er besteht aus zwei Spulen, bezw. Wicklungen von Heizdraht von verschiedenen abnehmenden Stärken. Ein Schleifkontakt, der durch ein bequem am vorderen Ende des

Apparates angebrachtes Handrad leicht variierbar ist, gestattet mehr oder weniger Windungen des Widerstandes einzuschalten, so daß damit der Widerstand und durch ihn die Temperatur, beziehungsweise die Geschwindigkeit der Temperatursteigerung im Apparat beliebig verändert werden kann. Die optimale Geschwindigkeit der Temperatursteigerung im Apparat wird erreicht, wenn man das Handrad so einstellt, daß der an ihm angebrachte Zeiger etwa in einem Winkel von 45° gegen die beiden Extremstellungen zu liegen kommt. Über dem Handrad ist ein drehbarer Schalter eingebaut, der die gesamte Apparatur ein- und auszuschalten gestattet. Seitlich ist an dem vorderen Ende des Widerstandes ein Steckkontakt angebracht, an dem der Schmelzpunktsapparat anzuschalten ist.

Die Beobachtung der zu schmelzenden Kristalle geschieht für gewöhnlich im durchfallenden Licht, also bei gewöhnlicher Mikroskopbeobachtung. Bei sehr schwach lichtbrechenden und wenig scharf konturierten Kristallen empfiehlt es sich, statt im durchfallenden Licht im auffallenden zu beobachten, da die Kristalle auf dunklem Untergrund hell leuchtend hervortreten. Das auffallende Licht wird einfach durch schiefe Beleuchtung mit einer gewöhnlichen Mikroskopierlampe von oben auf den Objektträger erzielt. Ein Opakilluminator kam für die verwendeten Vergrößerungen nicht in Betracht und hat sich auch nicht bewährt. Als Lichtquelle ist künstliches und natürliches Licht zu verwenden. Zur Feststellung der Zersetzungsprodukte ist die Anwendung möglichst konstanter Lichtquellen notwendig, da sich mit dem Licht auch die Zersetzungspunkte der Substanzen verändert darstellen.

Das mit dem Apparat erreichbare Temperaturintervall liegt zwischen 50 und 350° C, wobei wesentlich ist, daß nach einmaliger Eichung der Apparat für das weite Intervall von 300° die richtigen Temperaturen anzeigt. Die Objekte können mit Vergrößerungen von 30- bis 600mal (Obj. 5, Komp. Okul. 12) untersucht werden.

Ein Abschmelzen der Linsenkittung konnte mit Reichert-Mikroskopen nie beobachtet werden, ebensowenig ein Springen des Kondensors*).

*) Der Schmelzpunktsapparat samt Widerstand ist, eichungsmäßig geprüft, bei den optischen Werken C Reichert, Wien, VIII., Bennogasse 24, vorrätig.

Der Apparat ist mit folgenden Substanzen geeicht:

Substanz	Literatur-Fp.	Gefundener Fp.
Chloralhydrat	57	57
Vanillin	81 — 81.9	81.5—82
α-Naphtol	96	96
Zimtsäure	133	133.5
Zitronensäure	153 —154	153.5
Weinsäure	168	168
Laktose	203.5	203.5
Querzit	234	234
Strychnin	268	272
Querzitrin	310	310

Methodik.

Herstellung des Präparates. Hat man chemisch reine Substanz zu prüfen, so wird diese auf einen gewöhnlichen Objektträger in feiner Form aufgetragen, verrieben oder aus einem Lösungsmittel aufkristallisiert und ein Deckglas aufgelegt.

Größere Kristalle schmelzen ungleich und verzögert. Für homogene Schichtdicke muß also Sorge getragen werden. Prinzipiell genügen 10 Mikrokriställchen (in einem Gesichtsfeld bei 120- bis 300facher Vergrößerung). Nur bei leicht flüchtigen Stoffen ist mehr Substanz nötig, wie später noch erörtert wird. Die Stoffe müssen auf jeden Fall vorerst im Chlorkalziumexsikkator (am besten schon am Objektträger, ohne Deckglas) getrocknet sein. Wasserhaltige Substanzen zerfließen weit vor dem Schmelzpunkt oder geben doch Wasser ab, in dem die Kriställchen dann schwimmen und verfrüht schmelzen. Bei unbekannten Stoffen wird der Apparat langsam angeheizt und fortlaufend mikroskopisch beobachtet. Für manche Substanzen muß die Temperatur möglichst rasch emporgetrieben werden, was ja in der Literatur bemerkt ist oder fallweise erprobt werden muß. Alles übrige, besonders Trocknen bei höherer Temperatur im Trockenschrank, bezw. im Vakuum gilt wie für Makroschmelzpunkte.

Dies alles gilt auch für irgendwie analytisch isolierte Stoffe. Hat man aber auf dem Objektträger aus einem Gewebsschnitt herausdiffundierte und außerhalb kristallisierte Substanz, so muß das Gewebe vorerst entfernt werden, da es durch Verkohlung stört. Auch dann beeinträchtigen die mitherausdiffundierten Stoffe (Gerbstoffe, Glykoside, Phenole usw.) das Feststellen eines reinen Schmelzpunktes der betreffenden Substanz.

Bei serienweisen Schmelzpunktsbestimmungen muß der Apparat nach jeder Bestimmung um etwa 100° unter den zu erwartenden Schmelzpunkt abgekühlt werden. Beim Abkühlenlassen um nur etwa 30° und darauffolgendem Anhitzen erhält man infolge nicht ganz gleichzeitigem Abkühlen von Heizfläche, Kondensor und Thermometer und noch weniger gleichmäßiger Temperatursteigerung dieser drei Zonen des Apparates nach Auflegen des kalten Objektträgers Fehler bis zu 10°.

Viele Stoffe lagern sich im Verlaufe der Temperatursteigerung zu anderen Kristallen um, die oft für die betreffende Substanz in Form und Farbe sehr charakteristisch sind. (Siehe Aminprodukte.[10g]) Andere sublimieren in schönen Kristallformen von Objektträger auf das Deckglas (Prinzip des KEMPF'schen Sublimationsapparates mit minimaler Steighöhe) und schmelzen erst 10 bis 80° später. Sollten also Kristalle allmählich vom Objektträger verschwinden, muß man durch Heben und Senken des Tubus fortlaufend ihr Erscheinen auf dem Deckglas kontrollieren. Dieses Absublimieren hat sich zur Reinigung der Substanz aus Verunreinigungen oder Fraktionierung aus einem Substanzgemisch, bezw. aus Gewebsschnitten sehr gut bewährt[10b]).

Hat man mehrere Substanzen beisammen, deren Sublimationspunkte weit genug auseinanderliegen (mindestens 30 bis 40°), so kann man durch langsames Anhitzen und Erhalten der Temperatur um den Sublimationspunkt der am niedrigsten sublimierenden Substanz diese fast quantitativ aufs Deckglas bekommen und durch Auswechseln dieses isolieren, worauf auf einem zweiten Deckglas die zweite Substanz fraktioniert erhalten werden kann usw. In unbekannten Substanzgemischen gibt dieses ungleiche Absublimieren mit folgenden divergenten Schmelzpunkten die ersten Anhaltspunkte über die Stoffe, die man vor sich hat[10g]).

Manche Stoffe sind aber so leicht flüchtig (z. B. Oxalsäure, Benzoësäure, Nikotinsäure, Aldimethonprodukte, daß sie nach dem Sublimieren aufs Deckglas auch seitlich über die Deckglasränder abstreichen und verschwinden, noch ehe der Schmelzpunkt erreicht ist. In diesem Falle muß das Deckglas luftdicht abgeschlossen werden. Nach mannigfachen Versuchen, schnelltrocknende Stoffe zu finden, die bis 400° weder schmelzen noch sich zersetzen, wurde das durch Verwendung von Calziumcaseinat erreicht. Gepulvertes Casein (Casein puriss. Merck) wird mit warmem Wasser in einem Malerschälchen zu einem homogenen, dünnen Brei angerührt, dann

frische Kalkmilch solange zugerührt, bis eine dicke Masse entsteht, die vom Rührstäbchen nicht mehr abtropft. Diese wird dann in dünner Schicht ringsum auf die Deckglasränder aufgetragen, so daß sie nicht unter das Deckglas dringt (Deckglas etwas aufpressen), sondern darübergreift.

Das Präparat kommt in den Exsikkator. Die Masse erstarrt in wenigen Minuten, trocknet in etwa 30 Minuten und schließt absolut luftdicht. Beim Erhitzen treten keine Sprünge auf, die Masse wird um 200° gelbbraun, um 300° tiefbraun und hält wie Zement.

Schließlich geben manche Verbindungen keine scharfen Schmelzpunkte, sondern Zersetzungspunkte, die um etwa 5° schwanken. (Metallsalzverbindungen, Dinitro-α-Napholate, Flavianate, Reinckesalzverbindungen usw.) Die Bestimmung der Zersetzungspunkte von Amindinitro-α-naphtolaten[1a-g]) hat sich uns glänzend bewährt.

Auch die Identifizierung einer Substanz durch gleichzeitiges Schmelzen mit der reinen Testsubstanz läßt sich eindeutig durchführen. Nur erhält man nicht wie bei der makroskopischen Bestimmung im Schmelzpunktröhrchen M i s c h s c h m e l z p u n k t e. Sind die Stoffe identisch, dann erhält man e i n e n Schmelzpunkt. Sind der untersuchte Stoff und die Testsubstanz nicht gleich, dann schmilzt jedes Kriställchen bei der ihm eigenen Temperatur. Nur wenn die Kristallmasse dicht „liegt", schmelzen die Kriställchen der höher schmelzenden Substanz im Schmelzfluß der früher schmelzenden manchmal früher, als es ihrem Schmelzpunkt entspricht (Situation der makroskopischen Bestimmung angenähert). Richtige Mischschmelzpunkte erhält man nur selten, entweder bei richtigen Mischkristallen, die sich beim gemeinsamen Ausfällen oder Auskristallisieren gebildet haben, oder wenn die beiden Substanzen in verschiedenen Mischungsverhältnissen vorliegen. Zum Beispiel geben die Acetaldehyd-Methonverbindung (Fp: 139°) und die Formaldehyd-Methonverbindung (Fp: 187°) einen Schmelzpunkt von 151°, wenn von ersterem etwa das Fünffache vorhanden ist.

Man muß sich in den Apparat einarbeiten, wie in jede Mikroapparatur. Wir haben ihn im Laufe der Jahre bei sehr vielen Untersuchungen immer mehr bewährt und unentbehrlich gefunden.

Im folgenden gebe ich eine Tabelle von ausgewählten Stoffen und von Produkten, die wir im Verlaufe von eigenen Untersuchungen immer wieder schmelzpunktsmäßig prüften.

A. Ausgewählte Substanzen:

Substanz	Sublimiert bei	Gefundener Fp.	Literatur-Fp.
Thymol	—	51	51.5
Cumarin	—	67	67
Dioxyaceton	—	73	68—75
Naphthalin	—	80	80
Brenzkatechin	—	107—110	104
Resorzin	—	113.5—115	118
Benzoesäure	—	121.5	121.4
Aucubin	—	130	130
Pyrogallol	—	133	133—133.5
Hydrochinon	—	148.5	169, 172
Salicylsäure	—	157.5	157
Chinasäure	—	169	169
Mannit	—	179	165—166
Coniferin	—	183	185
Zuckersäure	—	185	—
Saccharose	—	186.5	186
Salizin	—	200	201
Inosit	—	225	225
Fraxetin	195	228	227—228
Allantoin	—	231	231
Phloroglucin	—	233—235	219—220
Brenztraubensäuresemikarbazon	—	204—205	204
Brenztraubensäurephenylessig-Hydrazon	—	168	168

B. Alkaloide:

Substanz	Sublimiert bei	Gefundener Fp.	Literatur-Fp.
Angelikasäure[10e])	—	45	45.5—45
Tiglinsäure[10e])	—	65	64.5
Dibromveratrol[10e])	—	83	83—84
Piperin[10m])	—	129	128
Hydrastin[10d])	—	132	132
Hygrin dinitro-α-naphtolat[10l])	—	137	—
Pilocarpidin	—	138	—
Berberin	—	144	144
Veratrin Merck[10e])	—	149—151	150—155
Opiansäure[10d])	—	150	—
Echinopsin	—	158	152
Santonin	145	171	159.5—170
Hygrinsemicarbazid·HCl[10l])	—	177	—
Veratrumsäure[10e])	—	178	179.5
Ricinin[10f])	150	200	202
Cinchonidin	—	205	206.5
Phenyläthylamin	—	205	—
Cevadin[10g])	—	206	207.5
Pilocarpin	—	210	ca. 200

Substanz	Sublimiert bei	Gefundener Fp.	Literatur-Fp.
Piperinsäure[10m])	—	212	—
Trigonellin-HCl	—	215—218	260
Trigonellin, freie Base	—	218	218—220
Nikotinsäure (sublim. leicht weg)	—	232—235	228/29, 232
α-Naphtylamin-Xanthydrolprodukt	—	240	—
Tyramin-HCl	260—270	—	268—270
Cadaverin-HCl	—	275	—
Putreszin-HCl	315	—	—

C. Stickstoffprodukte:

Substanz	Sublimiert bei	Gefundener Fp.	Literatur-Fp.
Cholin dinitro-α-naphtolat	—	113	—
Colamintrinitrobenzoesäureprodukt	—	ca. 120	—
Lysinisocyanat	—	140—150	—
Colamin-dinitro-β-naphtolat	—	190	—
Glycocollisocyanat	—	190—195	190.5—191.5
Hydantoin hierzu	—	200	199—200
Dinaphtylharnstoff asymm.	—	210—217	192—193
Ornithinflavianat	—	234—235	Zsp.
Cystinisocyanat	180	225	—
Argininflavianat	—	258—260	258—260 Zsp.
Dinaphtylharnstoff symm.	—	298—300	293

D. Aldimethone[10c]):

Substanz	Sublimiert bei	Gefundener Fp.	Literatur-Fp.
Oenantholaldimethonanhydrid	—	110	—
Crotonaldimethonanhydrid	112	120	—
Aldolaldimethonanhydrid	85	126	—
Oenantholaldimethon	88	135	—
Isovaleraldimethon	110	137	—
Acetaldimethon	96	139	139—140
Butylaldimethonanhydrid	120	141	—
Butylaldimethon	114	142	142
Isobutylaldimethonanhydrid	103	144	—
Propionaldimethonanhydrid	120	148	—
Isobutylaldimethon	120	154	—
Propionaldimethon	109	155	155
Isovaleraldimethonanhydrid	113	168	168
Glyoxaldimethonanhydrid	106	170	—
Formaldimethonanhydrid	116	171	171
Acetaldimethonanhydrid	122	173	173
Crotonaldimethon	135	180—183	183
Aldolaldimethon	145	185	170—172
Formaldimethon	103	187	187
Glyoxaldimethon	165	228	—
Glyoxylsäuredimethon	162	239	208—209

E. Dinitro-α-naphtolate[10g]):

Substanz	Sublimiert bei	Zersetzungsp.	Literatur-Fp.
Triäthylamin	—	93	—
Tripropylamin	—	100	—
Diäthylamin	—	130	—
Dipropylamin	—	130	—
Allylamin	—	150	—
n-Butylamin	—	155	—
Di-i-Butylamin	—	155	—
n-Heptylamin	—	155	—
i-Propylamin	—	165	—
i-Butylamin	—	165	—
l-Amylamin	—	165	—
Aethylamin	—	170	—
Propylamin	—	170	—
Ammoniak	—	175	—
Dimethylamin	—	180	—
Methylamin	—	184	—
Trimethylamin	—	185	—
Dinitro α-Naphtol	—	132 Fp.	132

F. Xanthydrolprodukte[10k, i]):

Substanz	Sublimiert bei	Zersetzungsp.	Fp.
Allantoin	—	—	214
Thioharnstoff	180	—	220
Aethylidenharnstoff	230	230—235	—
Crotonylidenharnstoff	230	230—235	—
Acetdiureid	200	235	—
Dimethylolharnstoff	200	um 250	—
Monomethylolharnstoff	240	260	—
Formdiureid	235—260	um 260	—
Harnstoff	230	270	—
Xanthydrol	—	—	95—98

Literatur.

[1]) Weber H. Naturf. Vers. Karlsruhe. 1912. II. 2. S. 125.

[2]) Cram P. Journ. Americ. Chem. Soc. *34*. 954. 1912.

[3]) Siedentopf, siehe Emich, Methoden d. Mikrochemie, Abderhaldens Handbuch d. biolog. Arbeitsmethoden. Abt. I. *3*. 149.

[4]) Lehmann O. Abderhaldens Handb. d. biol. Arb. Abt. III. Teil A. Heft 2. 146. (1922.)

[5]) Loviton, siehe Mayerhofer A., Mikrochemie d. Arzneimittel u. Gifte, Urban & Schwarzenberg. 1923. 1. 264.

[6]) Friedel G. Revue d'optique *6*. 34. 1927; Deutsche opt. Wochenschr. *26*. 361. 1927; siehe auch: Zentral-Zeitung f. Opt. u. Mechanik 1928. Nr. 3. 30.

[7]) Roberts H. S. Zentr.-Ztg. f. Opt. u. Mech. Nr. 12. 162. 1927.
[8]) Niethammer A. Mikrochemie, VII. Neue Folge. Bd. I. 223. 1929.
[9a]) Klein G. „Pflanzliche Histochemie" in Fortschritte der Mikrochemie usw. v. G. Klein u. Strebinger. Deuticke, 1928. S. 62 u. 65.
[9b]) Klein G. Histochemie im Dienst der Warenkunde. Verlag Poeschel, Stuttgart 1927. S. 125.
[9c]) Klein G. Praktikum der Histochemie. Verlag Springer, Berlin 1929. S. 13.
[10a]) Klein G. u. Werner O. Biochem. Zeitschr. *168*. 361. 1926.
[10b]) Klein G. u. Pirschle K. Ebenda. *168*. 340. 1926.
[10c]) Klein G. u. Linser H. Diese Festschrift, S. 204.
[10d]) Klein G. u. Schilhab A. Österr. bot. Zeitschr. 77. 14. 1928.
[10e]) Klein G., Harndlhofer E. u. Tröthandl O. Ebendort. *77*. 111. 1928.
[10f]) Klein G. u. Bartosch H. Ebendort. *77*. 241. 1928.
[10g]) Klein G. u. Steiner M. Jahrb. f. wiss. Bot. *68*. 601. 1928.
[10h]) Klein G. Planta. 7. 422. 1929.
[10i]) Klein G. u. Tauböck K. Österr. bot. Zeitschr. *76*. 195. 1927.
[10k]) Tauböck K. Ebendort. *76*. 113. 1927.
[10l]) Klein G. u. Soos G. Ebendort. *78*. 157. 1929.
[10m]) Klein G. u. Krisch M. Ebendort. *78*. 257. 1929.
[10n]) Klein G. u. Pollauf G. Ebendort. *78*. 251. 1929.

Zur Charakteristik und Analytik der Aldehydmethonverbindungen.

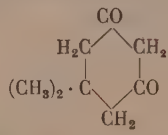
(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.)

Von **Gustav Klein** und **Hans Linser.**

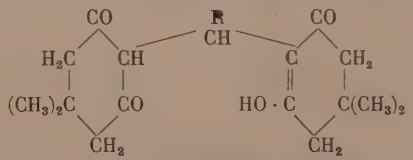
(Eingelangt am 20. Juni 1929.)

Dimethylhydroresorzin, das bekannte Reagens für alle niederen aliphatischen und zyklischen Aldehyde, wurde erstmalig von VORLÄNDER[1]) dargestellt und als brauchbares Aldehydreagens befunden, später von C. NEUBERG und seiner Schule[2]), G. KLEIN und seinen Schülern[3]), [7]) und anderen zur Abfangung von Aldehyden aus physiologischen Reaktionsketten verwendet.

Dimethylhydroresorzin (Dimethylhydrodioxybenzol) hat folgende Formel:



und erhielt von VORLÄNDER den Namen Methon, während NEUBERG[2]), G. KLEIN[3]), [7]) und andere die Bezeichnung „Dimedon" verwendeten. Da der Name Methon der allgemeinen chemischen Nomenklatur am nächsten steht, soll er im folgenden statt der Benennung Dimedon gebraucht werden. Die Reaktionsart von Dimethylhydroresorzin ist durch Verbindungen folgender Art charakterisiert, die ihrer Konstitution gemäß als Aldimethone bezeichnet wurden.



Die Aldimethone sind schön kristallisierende Produkte von weißer bis gelblicher Farbe, die durchweg schöne Sublimate liefern und deren Schmelzpunkte die im Mikroschmelzpunktapparat nach G. KLEIN[4]) noch erreichbaren Temperaturen (bis 350°) nicht übersteigen, so daß sie bequem auch in kleinsten Mengen noch zu identifizieren sind. Die physiologische Brauchbarkeit des Methons (und seiner Aldehydprodukte) wurde durch die Arbeiten von NEUBERG und KLEIN erwiesen. Aber auch rein chemisch sind sie zur qualitativen wie auch zur quantitativen Aldehydbestimmung bestens verwendbar.

Bisher wurden folgende Aldimethone hergestellt:

Formaldimethon

(KALKOW[5]), VOLKHOLZ[6]), G. KLEIN und andere[3]), [7]),

Acetaldimethon
(VOLKHOLZ[6]), C. NEUBERG und andere[2]), G. KLEIN und andere[3]), [7]),
Propionaldimethon
(VOLKHOLZ[6]),
Isovaleraldimethon
(VOLKHOLZ[6]),
Oenantholdimethon
(VOLKHOLZ[6]),
Benzaldimethon
(VOLKHOLZ[6]), STRAUSS[8]),
Zimtaldimethon
(VOLKHOLZ[6]), STRAUSS[8])
Furfuroldimethon
(VOLKHOLZ[6]),
Glyoxylsäuredimethon
(VOLKHOLZ[6]),
Chloracetaldimethon
(VOLKHOLZ[6]),
Aldolaldimethon
(FRICKE[15]),
Crotonaldimethon
(FRICKE[15]),
Glyoxylsäuredimethon
(FRICKE[15]),
Akroleinaldimethon
(G. KLEIN[9]).

Zweck der vorliegenden Arbeit war es, die Aldimethone derjenigen Aldehyde genauer kennenzulernen, die möglicherweise aus den Reaktionsketten des pflanzlichen Stoffwechsels mit Hilfe verschiedener Methoden gewonnen werden könnten. Es wurden also die in Frage kommenden Aldehyde als Aldimethone dargestellt und ihre Eigenschaften und etwaige Trennungsmöglichkeiten studiert.

Darstellung der Aldimethone.

Zur Gewinnung der Aldimethone wurden je 1 bis 2 g Methon in 100 bis 200 ccm destilliertem Wasser unter Zusatz von etwas Natriumkarbonat am Wasserbad schwach erhitzt, bis vollkommene Lösung eingetreten war. Nach dem Erkalten wurde filtriert, um sowohl Verunreinigungen wie auch überschüssiges Methon zu entfernen und der betreffende Aldehyd in verdünnten (etwa 1- bis 5%igen), wässerigen Lösungen im Überschuß zugefügt. Manche Aldimethone fielen nun sofort aus, andere blieben noch in Lösung oder fielen nur äußerst langsam, da die Alkalilöslichkeit der be-

treffenden Produkte verhältnismäßig groß ist. Das Gemenge wurde daher mit verdünnter Salzsäure vorsichtig (um eine Anhydrisierung der Aldimethone zu vermeiden) angesäuert und einige Stunden stehengelassen. Dann wurde der Niederschlag abfiltriert, einige Male mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Dabei zeigte sich, daß die Aldimethone besser in Chlorkalziumexsikkatoren aufbewahrt werden als über Schwefelsäure, da über Schwefelsäure oft Zersetzungserscheinungen und auch Anhydrisierungen beobachtet werden konnten, die im Chlorkalziumexsikkator nicht auftraten.

Die eben erwähnte Darstellungsmethode eignet sich für die niedersten Aldehyde sehr gut. Bei einigen Aldehyden mit längeren Kohlenstoffketten, so z. B. bei Oenanthol, Aldol, aber auch bei Glyoxylsäure und besonders beim Crotonaldehyd, haben sich öfters Schwierigkeiten bemerkbar gemacht; meist war das Produkt mehr oder minder klebrig und verharzt, auch waren die Ausbeuten nur gering. Es bewährt sich statt einer wässerigen Methonlösung eine gesättigte, alkoholische Lösung; der Aldehyd wurde in alkoholischer oder in wässeriger Lösung zugefügt. Beide Methoden lieferten nach dem langsamen Abdunsten des Alkohols (beim Erhitzen treten Verharzungen auf!) sehr schöne, kristallisierte Produkte.

Mit Ausnahme des Crotonaldimethons sind alle Aldimethone recht stabile und gut haltbare Produkte, die sich auch in langer Zeit nicht oder fast nicht zersetzen.

Löslichkeitsverhältnisse der Aldimethone.

Um die Löslichkeit der einzelnen Aldimethone in den verschiedenen Lösungsmitteln vergleichsweise zu ermitteln, wurden annähernd gleiche Mengen der trockenen Produkte (0,01 bis 0,02 g) in Eprouvetten erst mit 0,5 ccm des Lösungsmittels behandelt, dann mit weiteren 0,5 ccm vermischt, so daß 1 ccm vorhanden war usf. 1 ccm, 2 ccm, 3 ccm, 5 ccm. Die Menge des zur vollständigen Lösung notwendigen Lösungsmittels gab, zusammen mit einer jeweiligen Schätzung des noch ungelösten Rückstandes und der bereits gelösten Substanz (es wurde jeweils ein Tropfen der Lösung eindunsten gelassen), die relative Löslichkeit des betreffenden Produktes. Eine genauere Bestimmung der Löslichkeiten wäre wegen der geringen vorhandenen Materialmengen zu ungenau und zu zeitraubend gewesen, auch bestand keine Notwendigkeit dazu,

da ja doch vorerst nur ein Überblick über ausschlaggebende Löslichkeitsdifferenzen und eventuell daraus ableitbare Trennungsmöglichkeiten erreicht werden sollte.

(Bei den folgenden Angaben bedeutet „leicht löslich", daß 10 bis 15 mg Substanz bereits von 0,5 ccm, bei 70% Aceton und Petroläther von 1 ccm Lösungsmittel glatt gelöst werden; „löslich" bezieht sich auf 1 bis 3 ccm, „schwer löslich" auf größere Mengen Lösungsmittel. „Unlöslich" besagt, daß beim Abdunsten eines Tropfens der Lösung nichts oder nur ein dünner Hauch von Substanz zurückbleibt.)

a) Löslichkeiten in Petroläther, leichtsiedende Fraktion (30 bis 50°).

Die trockenen Aldimethone sind in Petroläther in sehr verschiedenem Maße löslich. Bei physiologischen Versuchen zur Gewinnung der Aldimethone, das heißt beim Ausschütteln mit Petroläther aus sauren, wässerigen Lösungen ist natürlich zu beachten, daß sich auf Grund der Löslichkeitsverhältnisse in beiden Medien ein Gleichgewicht einstellt, das wohl zugunsten des Petroläthers verschoben ist, aber erst nach mehrmaliger Ausschüttelung zu einer möglichst erschöpfenden Überführung in Petroläther führt.

Formaldimethon, löslich
Acetaldimethon, leicht löslich
Propionaldimethon, löslich
Butylaldimethon, leicht löslich
Isobutylaldimethon, löslich
Isovaleraldimethon, löslich
Methon, schwer löslich
Oenantholdimethon, leicht lösl.
Akroleïnaldimethon, leicht lösl.
Glyoxaldimethon, schwer lösl.
Aldolaldimethon, schwer lösl.
Glyoxylsäuredim., schwer lösl.
Crotonaldimethon, schwer lösl.

b) Tetrachlorkohlenstoff:

Formaldimethon, löslich
Acetaldimethon, löslich
Propionaldimethon, löslich
Butylaldimethon, leicht löslich
Isobutylaldimethon, leicht lösl.
Isovaleraldimethon, schwer lösl.
Methon, schwer löslich
Oenantholdimethon, leicht lösl.
Akroleïnaldim., schwer lösl.
Glyoxaldimethon, fast unlösl.
Aldolaldimethon, schwer lösl.
Glyoxylsäuredimethon, schwer löslich
Crotonaldimethon, schwer lösl.

c) 75%iger Alkohol:

Formaldimethon, löslich
Acetaldimethon, leicht löslich
Propionaldimethon, löslich
Butylaldimethon, löslich
Isobutylaldimethon, löslich
Isovaleraldimethon, löslich

Methon, (leicht) löslich
Oenantholdimethon, löslich
Akroleïnaldimethon, löslich
Glyoxaldimethon, löslich
Aldolaldimethon, löslich
Glyoxylsäuredimethon, löslich
Crotonaldimethon, schwer lösl.

d) Aceton:

Alle leicht löslich, mit Ausnahme von Form-, Oenanthol- und Glyoxylsäuredimethon und Dimethylhydroresorzin, die schwerer löslich sind.

e) 70% Aceton:

Formaldimethon, schwer löslich
Acetaldimethon, schwer löslich
Propionaldimethon, schwer lösl.
Butylaldimethon, (schwer) lösl.
Isobutylaldimethon, schwer lösl.
Isovaleraldimethon, löslich
Methon, löslich
Oenantholdimethon, löslich
Akroleïnaldimethon, löslich
Glyoxaldimethon, löslich
Aldolaldimethon, löslich
Glyoxylsäuredimethon, schwer löslich
Crotonaldimethon, schwer lösl.

f) n-Butylalkohol:

Formaldimethon, (schwer) lösl.
Acetaldimethon, löslich
Propionaldimethon, löslich
Butylaldimethon, löslich
Isobutylaldimethon, fast unlösl.
Isovaleraldimethon, leicht lösl.
Methon, löslich
Oenantholdimethon, löslich
Akroleïnaldimethon, leicht lösl.
Glyoxaldimethon, löslich
Aldolaldimethon, leicht löslich
Glyoxylsäuredimethon, schwer löslich
Crotonaldimethon, schwer lösl.

g) 5% Natriumkarbonat:

Formaldimethon, (schwer) lösl.
Acetaldimethon, löslich
Propionaldimethon, leicht lösl.
Butylaldimethon, schwer lösl.
Isobutylaldimethon, löslich
Isovaleraldimethon, (leicht) löslich
Methon, (leicht) löslich
Oenantholdimeth., fast unlösl.
Akroleïnaldimeth., schwer lösl.
Glyoxaldimethon, leicht löslich
Aldolaldimethon, leicht löslich
Glyoxylsäuredimethon, löslich
Crotonaldimethon, schwer lösl.

Bei sämtlichen Löslichkeitsversuchen zeigte sich, daß die Aldimethone in keinem der angewandten Solventien völlig unlöslich

sind, daß vielmehr beim Abdampfen der Lösungen auch jener Versuche, bei denen äußerlich nichts von einer Lösung zu bemerken war, Rückstände erhalten wurden.

Etwas anders als die oben erwähnten Lösungsmittel verhielt sich 40%ige Schwefelsäure. Die Aldimethone sind in ihr bei Zimmertemperatur nur äußerst langsam und unter gleichzeitiger, teilweiser Anhydrisierung löslich.

h) 40%ige Schwefelsäure (in Wasser):

Die Aldimethone wurden mit kalter, 40%iger Schwefelsäure geschüttelt und dann stehengelassen. Bei einigen von ihnen trat sofort Lösung ein, andere waren nach Tagen, ja nach Wochen noch kaum merklich gelöst.

Formaldimethon, langsam, schwer löslich
Acetaldimethon, langsam, schwer löslich
Propionaldimethon, langsam, schwer löslich
Butylaldimethon, langsam, schwer löslich
Isobutylaldimethon, langsam, schwer löslich
Isovaleraldimethon, langsam, schwer löslich
Oenantholdimethon, langsam, schwer löslich
Akroleïnaldimethon, schnell, leicht löslich
Glyoxaldimethon, langsam, schwer löslich
Aldolaldimethon, schnell, leicht löslich
Glyoxylsäuredimethon, langsam, schwer löslich
Crotonaldimethon, langsam, schwer löslich
Methon, leicht löslich.

Die Löslichkeitsverhältnisse der Aldimethone lassen also allein kaum eine exakte Trennung der einzelnen Aldehydprodukte voneinander zu, da alle in allen Medien mehr oder weniger löslich sind und bei fraktionierter Lösung eines Gemisches die einzelnen Fraktionen einander immer verunreinigen müssen.

Fraktionierte Lösung wäre mit Erfolg nur bei größeren Substanzmengen und nur qualitativ möglich, indem man aus einem Gemisch durch kurzes Behandeln mit wenig Lösungsmittel einen Teil der am leichtesten löslichen Aldimethone extrahiert und dann mit dem gleichen Solvens solange wäscht, bis nur mehr ein Teil der schwerstlöslichen Produkte erhalten bleibt. Diese Methode setzt allerdings oft etwa gleiche Mengen der Produkte im Gemisch voraus (ein Fall, der bei physiologischen Versuchen nur selten

realisiert ist) und ist nur mit so großen Substanzmengen ausführbar, daß eine Trennung von Lösung und Rückstand sowie die Rückgewinnung des Produktes aus der Lösung noch möglich erscheint. Kleine, im Mikroschmelzapparat nicht mehr störende Verunreinigungen der Fraktionen durch die anderen sind nicht zu vermeiden.

Mit Hilfe dieser Methode lassen sich nur leicht lösliche Aldimethone von schwer löslichen trennen, also in 75%igem Alkohol, z. B. Croton- und Acetaldimethon, dagegen ist eine Trennung von Substanzen mittlerer Löslichkeit und ebenso eine Trennung dieser untereinander nicht mehr möglich. So sind auf diesem Wege Trennungen von Acet- und Butylaldimethon und anderer ähnlicher Gemische nicht gelungen.

Eine zweite Möglichkeit der Verwendung von Lösungsmitteln zur Trennung und Identifizierung der Aldimethone liegt in ihrer Verwendung als Waschflüssigkeit. Hat man am Deckglas ein Sublimat verschiedener Aldimethone vorliegen, so ist es möglich, die störende Substanz, falls sie leichter löslich ist als die gesuchte, zu identifizierende, mit einem geeigneten Lösungsmittel abzuwaschen, so daß von der unlöslichen Substanz noch ein verwendbarer Rückstand bleibt. Auch in dieser Weise wurden gute Trennungen von Acetaldimethon und Crotonaldimethon mit 75%igem Alkohol und mehrerer anderer Gemische erzielt. Als Lösungsmittel kommen hier alle oben erwähnten, mit Ausnahme der 40%igen Schwefelsäure, in Betracht, da diese nicht mehr vom Deckglas und dem daran haftenden (geringen) Rückstand entfernt werden kann.

Gemische von *mehr* als zwei (höchstens drei) verschiedenen Aldimethonen sind auf Grund der Löslichkeiten laut Erfahrung nicht mehr durchzuführen. Eine Verwendung obiger Trennungsmethoden ist also für einen allgemeinen, über die Zusammensetzung eines Gemisches orientierenden Trennungsgang höchstens zur Trennung letzter, bereits abgetrennter Fraktionen möglich. Eine Gruppentrennung läßt sich aus den oben angeführten Gründen nicht durchführen. Im besten Fall läßt sich eine Trennung in zwei Fraktionen durchführen, die beide dieselben Komponenten, jedoch in verschiedenen Mengenverhältnissen enthalten.

Sublimation der Aldimethone.

Die hier untersuchten Aldimethone waren sämtliche schön und leicht sublimierbar. Sublimationen wurden zum Zweck der Reini-

gung des Produktes jedesmal vor der Bestimmung des Mikroschmelzpunktes im Apparat nach G. KLEIN[4]), [10]) durchgeführt und anderseits zum Zwecke der Trennung durch fraktionierte Sublimation teils ebenfalls im G. KLEIN'schen Apparat, teils in einem neu konstruierten Apparat zur Sublimation größerer Substanzmengen unternommen.

a) Mikrosublimation am Mikroschmelzapparat nach G. KLEIN[4]), [10]).

Die zu sublimierenden Aldimethone wurden auf einem Objektträger möglichst flach ausgebreitet und ein Deckglas so aufgelegt, daß sich zwischen ihm und dem Objektträger ein oder zwei größere Quarzkörner oder Deckglassplitter befanden, so daß das Deckglas die Substanz nicht berührte, sondern in etwa 0,5 mm Höhe frei darüber lag. Dann wurde auf dem Mikroschmelzapparat erhitzt und gleichzeitig das Auftreten der Kristalle des Sublimats beobachtet. Nach dem Erscheinen der ersten Kristalle wurde der Apparat ausgeschaltet, die (Sublimations-) Temperatur bestimmt und dann weitererhitzt. Die Kristalle des Sublimats sind um so schöner ausgebildet, je langsamer man sublimieren läßt, das heißt je langsamer man die Temperatur steigert. Manche Aldimethone sublimieren meist nicht in Kristallen, sondern in Form von Tröpfchen, die sich erst später oder erst beim Erkalten zu Kristallen umlagern. (Methon, Akroleïnaldimethon und andere)*).

Formaldimethon:

Sublimiert bei 130° in feinen, an den Enden gerade abgeschnittenen Nadeln. Bei etwa 120° lagern sich die Nadeln in Prismen und Kurzstäbchen um. Meist Einzelkristalle; größere Aggregate selten, nur bei Sublimation hoch über dem Sublimationspunkt.

Acetaldemithon:

Sublimiert bei 96° in Prismen und Kurzstäbchen ähnlich denen des Formaldimethons nach seiner Umlagerung. Später keine Umlagerung. Einzelkristalle, jedoch auch Aggregate, oft in bogenförmiger Anordnung.

Propionaldimethon:

Sublimiert bei 109° in schiefwinkeligen, vierseitigen Platten und ebensolchen Prismen. Bildet, bei 115 bis 130° sublimiert, flache,

*) Eine Anhydrisierung der Aldimethone konnte, wie von anderer Seite theoretisch behauptet wird[13]), nie konstatiert werden.

große Aggregate aus eben diesen Platten. Kleinere Kristallaggregate bestehen meist aus 4 Platten.

Butylaldimethon:

Sublimiert bei 114° in Tropfen, die beim Erkalten auskristallisieren. Flache, langgestreckte, schiefwinkelige Platten; 4-, manchmal 6eckig, Einzelkristalle selten. Fast immer große Aggregate aus obigen Platten, deren Hauptachsen dann meist parallel liegen.

Isobutylaldimethon:

Sublimiert um 120° in Tropfen, die beim Erkalten teilweise große, dendritische Aggregate von schiefwinkeligen Prismen und Spießen bilden, teilweise auch in kleinsten Prismen und Nadeln erstarren.

Isovaleraldimethon:

Sublimiert bei 110° in einzelnen Spießen von Lanzettform, die aber oft zu größeren Aggregaten, Rosetten usw. vereinigt auftreten. Daneben flache, schiefwinkelige, viereckige Platten. Bei höheren Temperaturen (zwischen Sp. und Fp.) auch Tropfen.

Oenantholdimethon:

Sublimiert um 88° in Form von feinen, flach am Deckglas ausgebreiteten Büscheln, die meist bogig geschwungen sind. Daneben häufig Tropfen. Einzelkristalle klein, schlecht ausgebildet, nur an den Enden der Büschelaggregate.

Akroleïnaldimethon:

Sublimiert um 100° in Spießen, die fast immer zu Rosetten oder noch größeren, federartigen Aggregaten vereinigt sind. Einzelkristalle selten. Über dem Sublimationspunkt: Tropfen, die sich nach einiger Zeit in Kristalle umlagern.

Glyoxaldimethon:

Sublimiert um 165° in Tropfen, die beim Erkalten größere, zusammenhängende Aggregate aus kurzen Stäbchen und Prismen bilden. Neben den Tropfen treten Rosetten und Büschel von Nadeln und Stäbchen auf.

Aldolaldimethon:

Sublimiert bei 145° in Nadeln und Prismen, die, entweder parallel aneinandergelagert, Aggregate, oder, in radiärer Anordnung Büschel und Rosetten bilden. Einzelne Kristalle nicht häufig. Tropfen selten, nur hoch über dem Sublimationspunkt.

Glyoxylsäuredimethon:

Sublimiert bei 162° in einzelnen Nadeln, rechteckigen Platten und ebensolchen flachen Prismen. Später kleinste Spieße in kleinen Aggregaten. Statt diesen manchmal Tropfen, die erst beim Erkalten zu ebensolchen kleinen Spießen kristallisieren.

Dioxyacetonmethon:

Sublimiert bei 142° in schiefwinkeligen Prismen; keine Aggregate. Daneben Tropfen, die beim Erkalten erstarren, ohne schöne Kristalle zu bilden.

Crotonaldimethon:

Sublimiert bei etwa 135° in Form von Tropfen, die beim Erkalten in flachen, langgestreckten, sechsseitigen Tafeln auskristallisieren. Meist größere Aggregate.

Methon:

Sublimiert um 100° in Tropfen, die bald das Deckglas in kontinuierlicher Schicht überziehen. Bei etwa 120° kristallisieren daraus bogige, oft büschelförmige Aggregate aus spießartigen Kristallen und andere, gänzlich unregelmäßige Formen aus. Dendritische Formen häufig.

Bei allen Substanzen, die in Tropfen sublimierten, schmolzen die beim Erkalten aufgetretenen Kristalle bedeutend höher, als die betreffende Sublimationstemperatur betrug.

Die verschiedenen Höhen der Sublimationstemperaturen der einzelnen Aldimethone lassen eine Trennung auf Grund fraktionierter Sublimation zu. Praktisch kommen hier zur Trennung nur Gemische von Substanzen in Betracht, deren Sublimationspunkte genügend weit voneinander entfernt liegen. Denn abgesehen davon, daß die Temperatur nur schwer und innerhalb verhältnismäßig weiter Grenzen konstant zu halten ist (5 bis 10°), ist auch die Möglichkeit gegeben, daß sich als Sublimat Mischkristalle der beiden Substanzen bilden, da sie gleichzeitig sublimieren. [Es ist ja bekannt[11]), daß man durch langandauerndes Erhitzen auch unter der Sublimationstemperatur Sublimate erhalten kann. Eine längere Dauer der Sublimation ist jedoch, falls sie auch nur annähernd quantitativ sein soll, unumgänglich.] Derartige Mischkristalle zeigen neue Eigenschaften und andere Schmelzpunkte, die je nach den Mengenverhältnissen verschieden sind, und sind also

nicht brauchbar. So wurden aus einem Gemisch von Form- und Acetaldimethon Kristalle sublimiert, die bei 151° schmolzen. Unterschiede im Sublimationspunkt von etwa 30 bis 40° ließen jedoch bereits eine gute Trennung zu.

b) Sublimation größerer Mengen.

Um möglichst quantitative Trennungen durch fraktionierte Sublimation zu erreichen, wurden Versuche mit Acet-Aldolaldimethongemischen im Vakuumsublimationsapparat nach G. Klein und Werner[12]) unternommen, die jedoch kein befriedigendes Resultat ergaben. Ebensowenig erfolgreich verliefen Trennungsversuche im Sublimationsapparat nach Kempf[11]). Es mußte also nach anderen Möglichkeiten gesucht werden, um größere Substanzmengen in verhältnismäßig kurzer Zeit zu sublimieren. Endlich haben sich zwei Apparate als geeignet erwiesen.

Handelte es sich um Mengen, die nicht mehr als 3 bis 5 mg betrugen, so wurden sie auf einer Glasplatte möglichst flach ausgebreitet und ein Uhrglas dicht schließend darübergelegt. Das Ganze wurde auf einem vom Mikroskop abmontierten Mikroschmelzapparat nach G. Klein auf die gewünschte Temperatur gebracht.

Für größere Substanzmengen hingegen ist auch diese Methode unbrauchbar. Jedoch hat sich ein anderer Apparat hierfür als recht gut geeignet erwiesen. Er besteht (siehe Fig. 1) aus einem halbkugeligen Gefäß aus Jenaer Glas, dem mittels eines Schliffes ein an mehreren Stellen kugelig erweitertes Rohr angeschlossen ist, das dazu dient, das Sublimat der im Gefäß a befindlichen Substanz aufzunehmen. Der Apparat wird bis zum Schliff in ein Ölbad eingehängt, das auf die gewünschte Temperatur gebracht werden kann. Soll im Vakuum sublimiert werden, so schließt man bei b mit einem Quetschhahn ab und verbindet c mit einer Wasserstrahlpumpe. Da manche Substanzen nur auf recht geringe Steighöhe sublimierbar sind, wurde versucht, diese mit Hilfe eines Luftstromes zu vergrößern, was auch gelang. Es wurde zu diesem Zweck vor b eine Waschflasche mit konzentrierter Schwefelsäure vorgeschaltet, so daß ein trockener Luftstrom den Apparat passierte. Um die Stärke dieses Luftstromes zu regeln, wurde zwischen Apparat und Pumpe ein T-Rohr eingeschaltet, so daß man mittels des Quetschhahnes r mehr oder weniger Luft in die Pumpe strömen lassen konnte und so der durch den Apparat geleitete Luft-

strom zu regulieren war. Die Stärke dieses Stromes wurde durch die Zahl der Luftblasen, die die Schwefelsäureflasche passierten, schätzbar gemacht. Mit diesem Apparat konnte die Steighöhe von Acetaldimethon mit Luftstrom gegenüber jener ohne Luftstrom je nach dessen Stärke verdoppelt, verdreifacht und vervierfacht werden. Die zur quantitativen Sublimation von etwa 15 mg Acetaldimethon nötige Zeit betrug (im Luftstrom) etwa 20 Minuten. Die Substanzen, die sublimiert werden sollten, wurden in geeigneten, flüchtigen Lösungsmitteln gelöst, in das Gefäß a des Apparats gebracht, der Apparat montiert und das Lösungsmittel nun im Vakuum (wie bei Vakuumsublimation) bei niederer Temperatur eingedampft, so daß die Substanz in dünner Schicht zurückblieb. Dann wurde die Temperatur erhöht, bis der Sublimationspunkt erreicht war und dort etwa 20 Minuten konstant gehalten, während ein leichter Luftstrom durch den Apparat geleitet wurde. Nach dem Erkalten konnte das Sublimat aus dem Kugelrohr herausgelöst werden. Die Sublimation ging bei allen Substanzen, bei denen keine Zersetzung (infolge der hochliegenden Sublimationstemperatur) eintrat, vollkommen quantitativ. Ebenso verliefen Trennungen von Acet- und Aldolaldimethon und ähnlichen Gemischen.

In obigem Apparat sublimierten bei Temperaturen bis:

100° Oenanthol-, Acetaldimethon, Methon, Akroleïnaldimethon und schwach Isovaleraldimethon.

120° Form-, Propion-, Butyl-, Isovaleraldimethon.

130° Crotonaldimethon, Isobutylaldimethon.

150° Aldolaldimethon.

160° Glyoxylsäuredimethon.

170° Glyoxaldimethon.

Folgende Substanzen zeigten während der Sublimation (immer nur im Rückstand) Zersetzungserscheinungen:

a) Braunfärbung: Isobutyl-, Glyoxal-, Aldol-, Glyoxylsäure- und Crotonaldimethon.

b) Rotfärbung: Acet-, Isovaler-, Oenanthol-, Akroleïnaldimethon, Methon.

Geringe Steighöhe der Sublimate zeigten: Form-, Propion-, Glyoxylsäure- und Crotonaldimethon.

Als Ergebnis der Sublimationsversuche läßt sich sagen, daß Trennungen von Aldimethonen mittels fraktionierter Sublimation in besonderen, günstigen Mischungen möglich sind.

Schmelzpunkte der Aldimethone.

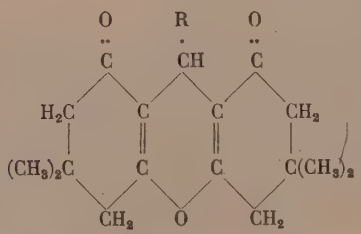
Zur Bestimmung der Schmelzpunkte nach G. Klein[4]) wurden die Deckgläser mit den Sublimaten der Aldimethone abgenommen, auf Objektträger aufgelegt und unter weiterem Steigern der Temperatur beobachtet, bis sich die Ränder der Kristalle abzurunden und die kleineren Kristalle wegzuschmelzen begannen. Die in diesem Moment abgelesene Temperatur stellt den Mikroschmelzpunkt dar. Kleinere Kristalle sublimierten oft schon unter dem Schmelzpunkt weg und wurden so unsichtbar, eine Erscheinung, die mit dem Schmelzpunkt nicht zu verwechseln ist.

Schmelzpunkte:

Formaldimethon 187°, scharf
Acetaldimethon 139°, scharf
Propionaldimethon 155°, scharf
Butylaldimethon 142°
Isobutylaldimethon 154°
Isovaleraldimethon 137°
Oenantholdimethon 135°
Akroleïnaldimethon 135°
Glyoxaldimethon 228° (teilweise Gelbfärbung)
Aldolaldimethon 184 bis 186° (langsam)
Glyoxylsäuredimethon 239° (unter Gelbfärbung)
Crotonaldimethon (nicht genau erhalten) um 180°, unter Gelbfärbung
Dioxyacetonmethon 186°
Methon 145 bis 148°

Darstellung der Anhydride.

Die Aldimethone gehen bei Behandlung mit Säuren, bezw. wasserentziehenden Mitteln mehr oder weniger leicht in ihre Anhydride über:



Zur Darstellung der Anhydride wurden mehrere Methoden verwendet:

a) Methode nach Volkholz[6]), modifiziert[3]):

Die Aldimethone werden mit 40%iger Schwefelsäure durch zwölf Stunden am Wasserbad erhitzt. Die Aldimethone lösten sich nur

sehr schwer (mit Ausnahmen, siehe Seite 7) und blieben selbst nach dem Kochen noch teilweise zurück. Die Lösung wurde durch Glaswolle filtriert und dann mit Wasser auf das zehnfache Volumen, also auf etwa 200 ccm (bei etwa 0,05 bis 0,1 g Aldimethon) verdünnt. Die Anhydride von Form-, Acetaldimethon und einigen anderen fielen aus, jedoch blieb immer ein großer Teil in Lösung; andere, wie z. B. Aldol- und Crotonaldimethon, blieben überhaupt in Lösung und waren nur durch Ausschüttelung mit Petroläther zu gewinnen.

b) Eisessig-Schwefelsäure-Gemisch:

Um die Aldimethone schon vor der Anhydrisierung in Lösung zu bringen, wurde ein Gemisch von 40% Schwefelsäure in 60% konzentrierter Essigsäure verwendet und damit 12 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Beim Verdünnen mit Wasser auf das zehnfache Volumen fielen die Anhydride mancher Aldimethone teilweise aus, andere blieben in Lösung.

c) Eisessig:

Die Aldimethone wurden in Eisessig gelöst und 10 bis 15 Stunden am Wasserbad erhitzt. Nach dem Verdünnen fielen die Anhydride von Form-, Acet-, Oenanthol-, Butyl-, Isobutylaldimethon aus, während die von Propion-, Aldol-, Glyoxal-, Croton-, Dioxyaceton- und Glyoxylsäuredimethon in Lösung blieben.

Bei allen diesen Anhydrisierungsversuchen hat sich die im Verhältnis zu den Substanzmengen ungeheuer große Flüssigkeitsmenge, mit der, besonders nach dem Verdünnen, gearbeitet werden mußte, insofern als störend erwiesen, als die Löslichkeit der Produkte trotz ihrer absoluten Kleinheit bereits eine große Rolle spielte. Die Fällungen waren nie quantitativ, immer blieb ein kleinerer oder größerer Teil des Produktes in Lösung und waren, eben infolge der großen Flüssigkeitsmengen, auch durch Ausschütteln mit Petroläther nicht quantitativ zu gewinnen. Am besten fiel Form- und Acetaldimethonanhydrid aus. Alle anderen zeigten bereits große Löslichkeit. Aus diesem Grunde läßt sich auch durch das Ausfallen, bezw. In-Lösung-Bleiben der Anhydride beim Verdünnen der Muttersubstanz keine Trennung der Aldimethone erreichen. Denn es wurde nicht nur die gelöste Fraktion durch die nur zum Teil ausgefällte verunreinigt, sondern auch umgekehrt die Fällung durch das (im Gemisch nur zum Großteil) in Lösung bleibende Produkt. Bei Anhydrisierung eines Gemisches

von Acet- und Aldolaldimethon (also eines ausfallenden und eines löslichen Anhydrides) enthielt die Fällung viel Acet-, daneben aber auch wenig Aldolaldimethonanhydrid, die lösliche Fraktion hingegen bestand aus viel Aldol- und weniger Acetaldimethonanhydrid.

Es läßt sich also hier wie bei allen anderen Löslichkeitstrennungen nur eine Verschiebung der Mengenverhältnisse der Komponenten, jedoch keine exakte Trennung erzielen.

d) Um eine einheitliche Methode zur Darstellung der Anhydride mit möglichst geringen Verlusten und als trockene Substanzen zu erlangen, wurde versucht, die großen Flüssigkeitsmengen auszuschalten und ohne sie zu arbeiten. Die Aldimethone wurden mit wenigen ccm 40%iger Schwefelsäure im Mikroextraktionsapparat etwa 2 Stunden hindurch gekocht, bis alle Substanz in Lösung war. Dann wurde mit festem, fein gepulvertem Bariumhydroxyd die freie Schwefelsäure gefällt, um ihr großes Lösungsvermögen für die Aldimethonanhydride auszuschalten. Der so entstandene Brei wurde gut mit Petroläther verrührt und ausgeschüttelt. War der Brei etwas zu kompakt, so wurde noch wenig Wasser zugefügt. Das Filtrat wurde im Scheidetrichter vom Wasser getrennt und der Petroläther im Vakuum eingedampft. Die Aldimethonanhydride blieben als Rückstand. Auf diesem Wege erhält man die Anhydride ohne nennenswerte Verluste und Umwege. Zum gleichen Erfolg wie Fällung der Schwefelsäure führt natürlich auch ihre Neutralisation durch Na_2CO_3 und dergleichen.

Löslichkeitsverhältnisse der Anhydride.

Trennungsversuche auf Grund verschiedener Löslichkeiten zeigten dieselben Nachteile, wie sie bei den Aldimethonen selbst bereits erörtert wurden. Trennungen mit organischen Lösungsmitteln waren hier wie dort nur beschränkt brauchbar. Jedoch zeigte sich 3%ige Sodalösung für brauchbare Trennungen gut geeignet. Eine derartige Trennung von Form- und Acetaldimethon haben ja auch bereits VOLKHOLZ[6]) und KLEIN und WERNER[8]) mit Erfolg angewendet.

a) Petroläther:

Formaldimethonanhydrid, löslich
Acetaldimethonanhydrid, löslich

Propionaldimethonanhydrid, löslich
Butylaldimethonanhydrid, leicht löslich
Isobutylaldimethonanhydrid, schwer löslich
Oenantholdimethonanhydrid, löslich
Isovaleraldimethonanhydrid, löslich
Glyoxaldimethonanhydrid, (schwer) löslich
Glyoxylsäuredimethonanhydrid, (schwer) löslich
Aldolaldimethonanhydrid, löslich.

b) Tetrachlorkohlenstoff:

Formaldimethonanhydrid, leicht löslich
Acetaldimethonanhydrid, leicht löslich
Propionaldimethonanhydrid, leicht löslich
Butylaldimethonanhydrid, leicht löslich
Isobutylaldimethonanhydrid, löslich
Isovaleraldimethonanhydrid, leicht löslich
Oenantholdimethonanhydrid, leicht löslich
Glyoxaldimethonanhydrid, schwer löslich
Glyoxylsäuredimethonanhydrid, schwer löslich
Aldolaldimethonhydrid, (schwer) löslich.

c) 3% Natriumkarbonat:

Formaldimethonanhydrid, leicht löslich
Acetaldimethonanhydrid, schwer löslich
Propionaldimethonanhydrid, schwer löslich
Butylaldimethonanhydrid, schwer löslich
Isobutylaldimethonanhydrid, schwer löslich
Isovaleraldimethonanhydrid, schwer löslich
Oenantholdimethonanhydrid, schwer löslich
Glyoxaldimethonanhydrid, schwer löslich
Glyoxylsäuredimethonanhydrid, löslich
Aldolaldimethonanhydrid, (leicht) löslich.

d) 96%iger Alkohol:

Formaldimethonanhydrid, löslich
Acetaldimethonanhydrid, leicht löslich
Propionaldimethonanhydrid, leicht löslich
Butylaldimethonanhydrid, leicht löslich
Isobutylaldimethonanhydrid, löslich.
Isovaleraldimethonanhydrid, löslich

Oenantholdimethonanhydrid, löslich
Glyoxaldimethonanhydrid, sehr schwer löslich
Glyoxylsäuredimethonanhydrid, sehr schwer löslich
Dioxyacetonmethonanhydrid, löslich.

Sublimation der Anhydride.

Formaldimethonanhydrid:

Sublimiert bei 116° in Prismen und Kurzstäbchen. Keine Aggregate.

Acetaldimethonanhydrid:

Sublimiert bei 122° in großen, flachen Spießen. Aggregate häufig.

Propionaldimethonanhydrid:

Sublimiert um 120° in Tropfen, die sich bei etwa 125° in flache Platten von 4-, 6- oder 8seitiger Gestalt umlagern, die große Aggregate bilden. Daneben Nadeln.

Butylaldimethonanhydrid:

Sublimiert bei 117° in Tropfen. Beim Erkalten Prismenaggregate.

Isobutylaldimethonanhydrid:

Sublimiert bei 103° in dendritischen Aggregaten und Nadeln und Stäbchen. Daneben kleinste, spießartige Kristallchen.

Isovaleraldimethonanhydrid:

Sublimiert bei 113° in kleinen Nadeln und Stäbchen.

Oenantholmethonanhydrid:

Sublimiert nicht, lagert sich jedoch bei 100 bis 105° in Büscheln von Spießen und Nadeln mit schiefer Endfläche um.

Akroleïnaldimethonanhydrid:

Braune Substanz, die nicht sublimiert und von 170 bis 190° langsam abschmilzt.

Glyoxaldimethonanhydrid:

Sublimiert bei 106° in Tropfen und flachen, langen Prismen. Aggregate.

Glyoxylsäuredimethonanhydrid:

Sublimiert um 160°. Längliche Prismen und Platten. Keine Aggregate.

Aldolaldimethonanhydrid:

Sublimiert bei 85° in kleinen, einzelnen Doppelpyramiden. (Sehr charakteristisch!)

Crotonaldimethonanhydrid:

Sublimiert bei 112° in Tropfen, die beim Erkalten schiefwinkelige Nadeln und Platten bilden. (Daneben auch rechtwinkelige Platten.)

Die Aldimethonanhydride zeigen sich für Trennungen durch fraktionierte Sublimation bestens geeignet. Auch sind sie durch ihre oft charakteristischen Kristallformen (Acet-, Aldol-) leicht und eindeutig zu identifizieren.

Schmelzpunkte der Aldimethonanhydride.

Formaldimethonanhydrid 171°
Acetaldimethonanhydrid 173°
Propionaldimethonanhydrid 148°
Butylaldimethonanhydrid 141°
Isobutylaldimethonanhydrid 144°
Isovaleraldimethonanhydrid 168°
Oenantholdimethonanhydrid 110°
Akroleïnaldimethonanhydrid 170 bis 188°
Glyoxaldimethonanhydrid 170°
Glyoxylsäuredimethonanhydrid 245°
Aldolaldimethonanhydrid 126°
Crotonaldimethonanhydrid 120°.

Mikrodestillationen der Aldimethone und ihrer Anhydride.

Zur Spaltung, bezw. Reinigung von Aldimethonen und zur Gewinnung der Aldimethone aus ihren Anhydriden wurden diese nach dem Verfahren von Klein und Werner[3]) in Mikrodestillationskolben mit 3 bis 4 Tropfen Phosphorsäure und etwas Wasser versetzt und destilliert. Als Vorlage wurde eine schwach alkalische, 1%ige Lösung von Methon verwendet. Die Temperaturen, bei denen destilliert wurde, lagen zwischen 100 und 200°. Bereits während der Destillation traten in der Vorlage Fällungen von Aldimethon auf, die dann nach längerem Stehen abzentrifugiert werden konnten. Nicht alle Aldimethone ließen sich auf diese Weise gleich gut destillieren.

Glyoxylsäuredimethon ließ keine Glyoxylsäure destillieren, in der Vorlage trat kein Aldimethon auf.

Glyoxylsäuredethonanhydrid, sehr schwach
Aldolaldimethon, sehr schwach
Formaldimethon, mäßig
Formaldimethonanhydrid, leicht
Acetaldimethon, leicht
Acetaldimethonanhydrid, leicht
Propionaldimethon, leicht
Propionaldimethonanhydrid, leicht
Butylaldimethon, schwach
Butylaldimethonanhydrid, schwach
Isobutylaldimethon, leicht
Isobutylaldimethonanhydrid, schwach
Isovaleraldimethon, leicht
Akroleïnaldimethon, leicht
Oenantholdimethon, leicht
Oenantholdimethonanhydrid, leicht
Glyoxaldimethon, (sehr) leicht
Glyoxaldimethonanhydrid, (sehr) leicht.

Die Destillation geht nicht quantitativ; die Rückstände an nichtdestillierter Substanz sind verkohlt und unbrauchbar.

Zum Zweck der Reinigung können also nur Gemische jener Aldimethone ohne große Substanzverluste gespalten und überdestilliert werden, deren Komponenten leicht destillierbar sind. Für den Fall, daß der Aldol- oder der Glyoxylsäuredimethon störend wirken sollte, lassen sich diese, falls man auf sie weiterhin verzichten kann, durch Destillation namentlich dann gut von den anderen als Rückstand abtrennen, wenn man bei nicht allzu hoher Temperatur und ohne Wasser destilliert.

Zusammenfassung der Trennungsmöglichkeiten.

Aus obigen Untersuchungen geht hervor, daß exakte, quantitative Trennungen von Aldimethonen nur in einzelnen Fällen, je nach der Zusammensetzung der Gemische, möglich sind.

An diesem Umstand scheiterte der Versuch, einen allgemeinen Trennungsgang für alle dargestellten Aldimethone zu finden. Es hat sich keine Möglichkeit ergeben, exakte Gruppentrennungen vorzunehmen.

Dagegen ergaben sich Trennungsmethoden für Gemische nur

weniger Aldimethone, die mit großer Sicherheit arbeiten. Es war möglich, vielerlei Gemische von je zwei oder drei Aldimethonen qualitativ und manchmal auch quantitativ eindeutig zu bestimmen, ein Ergebnis, das im allgemeinen für die Zwecke der physiologischen Chemie ausreichen dürfte, da ja Gemische von mehr als zwei oder drei Aldehyden nie oder nur selten in einem Aufarbeitungsgang aus einem Versuch vorliegen werden.

Der Gang der Trennungen war folgender: Die zu untersuchende Substanz wurde im Mikroschmelzpunktapparat sublimiert und geschmolzen*), wobei sich bereits Anhaltspunkte über die Zusammensetzung ergaben. Auf Grund der Schmelz- und Sublimationspunkte sowie besonders der Kristallformen der Aldimethone sowohl als auch ihrer Anhydride, die immer parallel dazu hergestellt wurden, ließ sich feststellen, welche Aldimethone überhaupt in Betracht kamen, und für diese wurde dann auf Grund der in dieser Arbeit beobachteten Eigenschaften ein für den besonderen Fall angepaßter Trennungsgang konstruiert.

Beispiele für Trennungen.

a) Trennung von Acet- und Aldolaldimethon.

Die Substanz wurde anhydrisiert (wobei schon beim Lösen in 40%iger Schwefelsäure viel Acetaldimethon [Löslichkeitstabelle!] abfiltriert werden konnte) und dann fraktioniert sublimiert. Das charakteristisch sublimierende Aldolaldimethonanhydrid wurde so schön (bei etwa 90°) quantitativ vom Acetaldimethonanhydrid getrennt.

b) Trennung von Glyoxylsäure-, Croton- und Acetaldimethon.

Die Substanz wurde mit Phosphorsäure versetzt und wie angegeben mikrodestilliert. Der in der Vorlage entstandene Aldimethonniederschlag wurde abzentrifugiert und langsam sublimiert. Um den beim Schmelzen störenden (weil früher schmelzenden) Acetaldimethon zu entfernen, wurde das Deckglas mit dem Sublimat kurze Zeit in 75%igen Alkohol getaucht und dann trocknen gelassen. Der noch daranhaftende Rückstand war frei von Acetaldimethon und gab Sublimations- und Schmelzpunkt von Crotonaldimethon.

c) Durch fraktionierte Sublimation konnten folgende Gemische quantitativ getrennt werden:

*) Die Bildung von Mischkristallen wurde dabei durch vorsichtiges Sublimieren bei langsamer Steigerung der Temperatur möglichst zu verhindern versucht.

Acetaldimethonanhydrid / Aldolaldimethonanhydrid
Acetaldimethon / Glyoxaldimethon
Acetaldimethon / Glyoxylsäuredimethon
Formaldimethon / Glyoxylsäuredimethon
Formaldimethon / Glyoxaldimethon
Propionaldimethon / Glyoxaldimethon
Isovaleraldimethon / Glyoxylsäuredimethon
Isovaleraldimethon / Aldolaldimethon
Oenantholaldimethon / Aldolaldimethon
Oenantholaldimethon / Crotonaldimethon.

Bei allen diesen fraktionierten Sublimationen ist darauf zu achten, daß niemals über der Schmelztemperatur der zu sublimierenden Substanz sublimiert wird, da sonst das geschmolzene Produkt die andere Komponente der Mischung in Lösung und zum Mitsublimieren bringen kann, so daß eine Fraktionierung nicht eintreten kann.

d) Auf Grund der verschiedenen Löslichkeiten gelangen folgende Trennungen gut:

Mit Tetrachlorkohlenstoff:
Glyoxaldimethon / Butylaldimethon
Glyoxaldimethon / Isobutylaldimethon
Glyoxaldimethon / Oenantholdimethon.
Mit 3% Natriumkarbonat:
Die Anhydride von:
Formaldimethon / Acetaldimethon
Formaldimethon / Oenantholaldimethon
Formaldimethon / Glyoxaldimethon.
Mit 5% Natriumkarbonat:
Oenantholdimethon / Glyoxaldimethon
Oenantholdimethon / Propionaldimethon.
Mit Butylalkohol:
Isobutylaldimethon / Isovaleraldimethon
Isobutylaldimethon / Akroleïnaldimethon.

Die Gemische wurden kurz mit dem Lösungsmittel geschüttelt und die Lösung dann abgesaugt. Der Rückstand wurde dann nochmals mit dem Lösungsmittel geschüttelt und dann abermals abfiltriert. Das Produkt der ersten Lösungsfraktion und der letzte Rückstand wurde sublimations- und schmelzpunktmäßig identifiziert und waren beide frei von störenden Verunreinigungen der anderen Fraktion.

Die Glyoxylsäure.

Entsprechend den Eigenschaften der Glyoxylsäure als Aldehyd und als Säure ist eine Abtrennung von den übrigen Aldehyden wohl möglich. Die Glyoxylsäure gibt ein schönes Bleisalz, so daß es möglich ist, sie vor der Aldehydbindung durch Methon mit Blei abzubinden. Da dieses Bleisalz wenig charakteristisch ist, so führt man, wenn man sie gesondert identifizieren will, die Glyoxylsäure daraus am besten in das Methonprodukt über, indem man das Bleisalz in Salzsäure löst und in eine neutrale oder alkalische Lösung von Methon eingießt, worauf das Glyoxylsäuredimethon schön kristallinisch ausfällt.

Anderseits läßt sich die Glyoxylsäure aus ihrem Methonprodukt in ihr Bleisalz überführen, indem man seine wässerige Lösung oder Aufschwemmung mit Bleiacetat versetzt und einige Zeit hindurch kocht. Es entsteht eine Fällung des Bleisalzes der Glyoxylsäure. Dieses ist, im Gegensatz zu dem eventuell gleichzeitig entstehenden Bleikarbonat in verdünnter Essigsäure und zum Gegensatz der Methonprodukte in Azeton, unlöslich, so daß es leicht als reines Produkt erhalten und wie oben angegeben wieder in das Methonprodukt übergeführt werden kann. Hierdurch ist eine exakte Trennung von den übrigen Aldehyden möglich. Eine Trennung vom Glyoxaldimethon, bezw. vom freien Glyoxal ist auf diesem Wege, infolge der Eigenschaft des Glyoxal, leicht zu Glyoxylsäure oxydiert zu werden, nicht möglich.

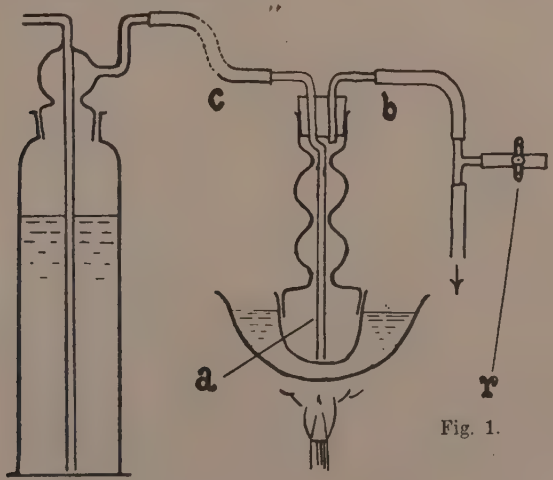


Fig. 1.

Tabelle 1. **Eigenschaften der**

Aldimethon	Formel das Aldehydes	Sublim. Punkt	Fp.	Abbildung	3% Soda
Form-	HCOH	103°	187°	1	—
„ -Anhyd.		116°	171°	2	leicht
Acet-	CH_3COH	96°	139°	3	—
„ -Anhyd.		122°	173°	4	schwer
Propion-	CH_3CH_2COH	109°	155°	5	—
„ -Anhyd		120°	148°	6	schwer
Butyl-	$CH_3(CH_2)_2COH$	114°	142°	7	—
„ -Anhyd.		120°	141°	8	schwer
Isobutyl-	$(CH_3)_2CH \cdot COH$	120°	154°	9	—
„ -Anhyd.		103°	144°	10	schwer
Isovaler-	$(CH_3)_2CHCH_2COH$	110°	137°	11	—
„ -Anhyd.		113°	168°	12	schwer
Oenanthol-	$CH_3(CH_2)_5COH$	88°	135°	13	—
„ -Anhyd.		—	110°	14	schwer
Akrolein-	$CH_2:CH \cdot COH$	70-118°	135°	15	—
„ -Anhyd.		—	170-188°	—	—
Glyoxal-	$COH \cdot COH$	165°	228°	16	—
„ -Anhyd.		106°	170°	17	schwer
Glyoxylsäure-	$COH \cdot COOH$	162°	239°	18	—
„ -Anhyd.		160°	245°	19	löslich
Aldol-	$CH_3CHOHCH_2COH$	145°	184-186°	20	—
„ -Anhyd.		85-88°	126°	21	—
Croton-	$CH_3CH:CH \cdot COH$	135°	180—183°	22	—
„ -Anhyd.		112°	120°	23	—
Methon		100°	145-148°	26	leichtlösl.

Methonprodukte.

5% Soda	75% Alkohol	Petroläther	Tetrachlorkohlenstoff	70% Aceton	Butylalkohol	96% Alkohol	40% Schwefelsäure
schw.lösl.	löslich	löslich	löslich	schwer	schw.lösl.	—	schwer
—	—	löslich	leicht	—	—	löslich	—
löslich	leicht	leicht	löslich	schwer	löslich	—	schwer
—	—	löslich	leicht	—	—	leicht	—
leicht	löslich	löslich	löslich	schwer	löslich	—	schwer
—	—	löslich	leicht	—	—	leicht	—
schwer	löslich	leicht	leicht	löslich	löslich	—	schwer
—	—	leicht	leicht	—	—	leicht	—
löslich	löslich	löslich	leicht	schwer	fast unlöslich	—	schwer
—	—	schwer	löslich	—	—	löslich	—
löslich	löslich	löslich	schwer	löslich	leicht	—	schwer
—	—	löslich	leicht	—	—	löslich	—
fast unlöslich	löslich	leicht	leicht	löslich	löslich	—	schwer
—	—	löslich	leicht	—	—	löslich	—
löslich	löslich	leicht	schwer	löslich	leicht	—	leicht
—	—	—	—	—	—	—	—
leicht	löslich	schwer	fast unl.	löslich	löslich	schwer	schwer
—	—	löslich	schwer	—	—	—	—
löslich	löslich	schwer	schwer	schwer	schwer	—	schwer
—	—	löslich	schwer	—	—	schwer	—
leicht	löslich	schwer	schwer	löslich	leicht	—	leicht
—	—	—	—	—	—	—	—
schwer	schwer	schwer	schwer	schwer	schwer	schwer	schwer
—	—	—	—	—	—	—	—
leicht	leicht	schwer	schwer	löslich	löslich	leicht	leicht

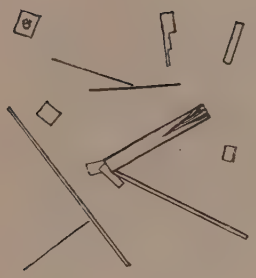
Literatur.

[1]) D. Vorländer, Chem. Ber. *30*. 1801 (1897); Liebigs Ann. *294*. 252 (1897).
[2]) C. Neuberg u. E. Reinfurth, Bioch. Zeitschr. *106*. 281 (1920); C. Neuberg u. A. Gottschalk, Bioch. Zeitschr. *151*. 167 (1924).
[3]) G. Klein u. O. Werner, Bioch. Zeitschr. *168*. 256 (1925).
[4]) G. Klein. Ein bewährter Mikroschmelzpunktsapparat, diese Festschrift. S. 192.
[5]) F. Kalkow, Über die Formaldehydverbindung des Hydroresorzins, Dissert. Halle a. S. 1897. c. f. Ann. 294.
[6]) H. Volkholz, Bestimmung von Aldehyden mit Dimethylhydroresorzin, Halle a. S. 1902.
[7]) G. Klein u. K. Pirschle, Bioch. Zeitschr. *168*. 340 (1926); G. Klein u. F. Svolba, Zeitschr. f. Bot. *19*. 65 (1926).
[8]) O. Strauss, Hydrierte Derivate des Diphenyl- und Triphenylmethans, Dissert. Halle a. S. 1899. c. f. Ann. 252.
[9]) G. Klein, Bioch. Zeitschr. *168*. 132 (1925).
[10]) G. Klein, Praktikum der Histochemie. Springer 1929.
[11]) Zeitschr. f. analyt. Chem. *62*. 284 (1923).
[12]) G. Klein u. O. Werner, Zeitschr. f. physiolog. Chem. *143*. 141 (1925).
[13]) D. Vorländer, Planta. *6*. 684 (1928).
[14]) Stepp u. Feulgen, Zeitschr. f. phys. Chem. *114*, 301 (1921); Zeitschr. f. phys. Chem. *119*. 72 (1922).
[15]) R. Fricke, Zeitschr. f. phys. Chem. *116*. 129 (1921).

Kristallformen der Sublimate der Aldimethone.

Folgende Tafeln geben die charakteristischen Kristallformen der einzelnen Aldimethone und ihrer Anhydride als Sublimate am Deckglas wieder.

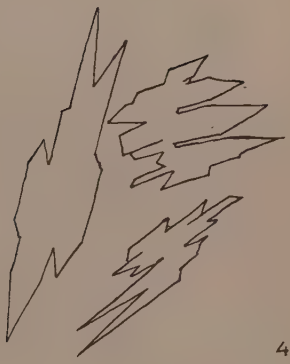
1. Formaldimethon
2. Formaldimethonanhydrid
3. Acetaldimethon
4. Acetaldimethonanhydrid
5. Propionaldimethon
6. Propionaldimethonanhydrid
7. Butylaldimethon
8. Butylaldimethonanhydrid
9. Isobutylaldimethon
10. Isobutylaldimethon-anhydrid
11. Isovaleraldimethon
12. Isovaleraldimethonanhydrid
13. Oenantholdimethon
14. Oenantholdimethon-anhydrid
15. Akroleïnaldimethon
16. Glyoxaldimethon
17. Glyoxaldimethonanhydrid
18. Glyoxylsäuredimethon
19. Glyoxylsäuredimethon-anhydrid
20. Aldolaldimethon
21. Aldolaldimethonanhydrid
22. Crotonaldimethon
23. Crotonaldimethonanhydrid
24. Dioxyacetonmethon
25. Dioxyacetonmethonanhydrid
26. Dimethylhydroresozin (Methon).



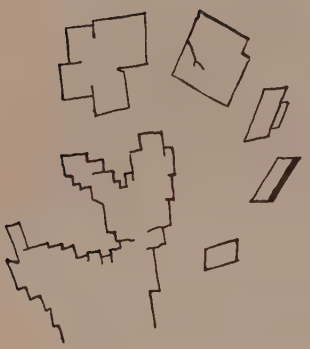
1

2

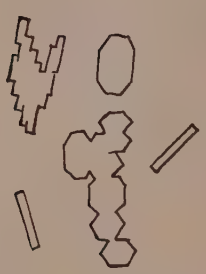
3



4

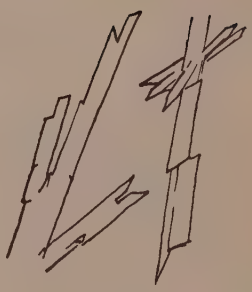


5

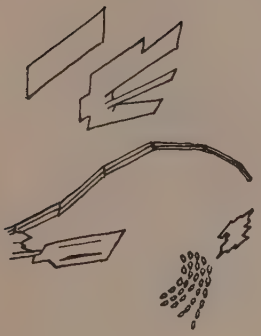


6

7



8



9

10

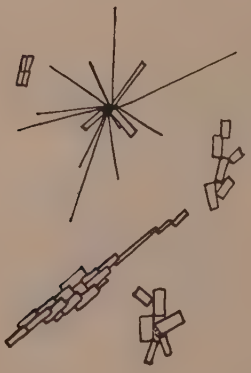
11

12

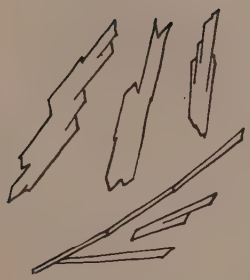
13

14

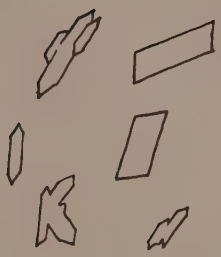
15



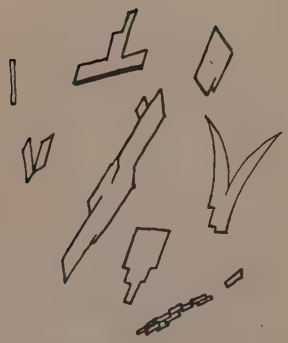
16



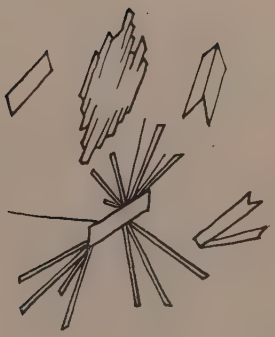
17



18

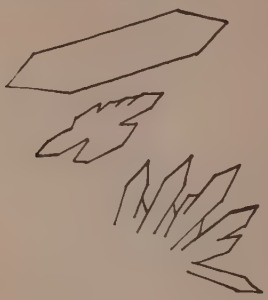


19

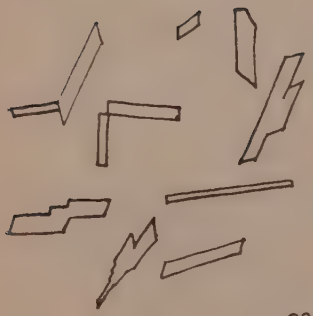


20

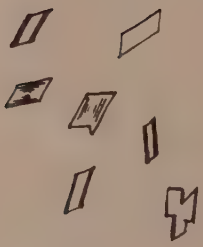
21



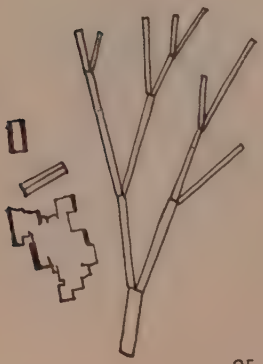
22



23



24



25

26

An Adaptation of Pregl's Microcombustion to a Semi-microcombustion Method for the Determination of Nitrogen.

By **Walter M. Lauer** and **Conrad J. Sunde.**

(Contribution from the School of Chemistry of the University of Minnesota.)

During the spring of 1925, DOBROVOLNY and one of us (W. M. L.) devised a semi-micro combustion method for the determination of carbon and hydrogen in organic compounds. Since this method proved to be quite serviceable in the hands of others, it was considered advisable to attempt the development of a similar method for nitrogen. Here again, the admirable work of PREGL served as the foundation upon which this semi-micro method was based. A twenty milligram sample was used and the weighings were performed on a high-grade analytical balance sensitive to $^1/_{20}$ the mgm. The procedure here described has been found to yield satisfactory results, and the necessary technique is easily acquired.

Description of Apparatus.

The Source of Carbon Dioxyde:

Carbon Dioxide was perpared by means of a Kipp Generator in the manner prescribed by PREGL[1]).

The Combustion Tube and Filling:

The combustion tube consisted of a 13 mm. (inside diameter) Pyrex tube, 45 cm. in length, sealed to a 5 mm. (inside diameter) tube 8 cm. long. It was attached to the Kipp Generator by means of a capillary tube (A) fitted with a stop cock (not shown in diagram). The combustion tube was filled as follows: A small plug of ignited asbestos was first passed into place in the neck of the tube. An 8—8.5 cm. layer of wire form copper oxide (E) was then introduced. Another plug of asbestos served to hold this copper oxide in place. A roll of copper gauze (D) 4 cm. in length, wich had been reduced by means of methyl alcohol was then put into place, followed by a plug of asbestos. A 7 cm. layer of copper

[1]) Quantitative Organic Microanalysis, F. PREGL. — Translated y FYLEMAN; J. & A. CHURCHILL, London, p. 79.

oxide (C) similar to the copper oxide first used, followed by a plug of asbestos, completed the permanent filling of the tube.

A porcelain boat, containing the sample mixed with powdered copper wire oxide and a roll of oxidized copper gauze (B) completes the tube filling.

The use of an oxidized copper spiral simplifies the work of introducing new samples. After heating in air to bring about reoxidation it is ready for use again. The combustion tube was supported by means of an iron trough, 14 inches long, made from angle iron. This trough was sawed into sections from the lower edge to within $^3/_8$″ of the two upper edges. Two side arms served to fasten the trough to ringstands. A layer of asbestos paper was placed in the trough under the combustion tube. Iron or asbestos covers (2 inches long) were also provided. Three burners, fitted with wing-tops supplied the heat.

The Absorption Apparatus (F).

The absorption apparatus, F, which has a total length of 65 cm. and an internal diameter of 1—2 to 1—4 cm. is similar to a SCHIFF azotometer. Its construction and relation to the remainder of the apparatus is indicated in the figure.

The Measuring Burette (G).

The measuring burette (G) consists of a piece of glass tubing with an internal diameter of about 4 mm. sealed to a capillary tube carrying a stop-cock. The length of this 4 mm. tube should be sufficient to give the burette a capacity of about 5 mm. The measuring burette is surrounded with a waterjacket and connected to a levelling bulb by means of a piece of rubber tubing.

The absorption tube, the measuring burette and the two levelling bulbs are filled with a 33% solution of potassium hydroxide.

A zero mark is etched on the capillary part of the measuring burette and the calibration is carried out using 33% KOH as the calibrating liquid, reading the distance from the zero point to the meniscus on a millimeter scale and weighing the KOH solution removed. A curve is then plotted showing the relationship between these distances and the corresponding volumes.

Detailled Procedure.

After the Kipp generator has been treated as described, the combustion tube filled, all joints made tight, the stop-cocks greased, the absorption tube, and measuring burette, etc., filled

with the 33% potassium hydroxide solution, the 3-way stop-cock closed, the levelling bulb attached to F lowered, the stop-cock between F and E and that between A and the generator are opened so as to sweep the air out of the combustion tube. The air collects above the alkali solution in the absorption tube and is let out by opening the 3-way stop-cock. During the operation the stop-cock between E and F is closed and the levelling bulb attached to F is raised in order to drive out the air. If the residues from the bubbles rising in the potassium hydroxide solution are barely perceptible the carbon dioxide is of sufficient purity to be used, if they are not, the stop-cock between E and F is closed and the plug of the stop-cock, between the generator and A, lifted slightly so as to let most of the carbon dioxide escape. The acid then rises into the middle bulb of the generator, with a resulting rapid evolution of gas. If some of this gas is allowed to escape the air that has collected in the middle bulb will soon be driven out.

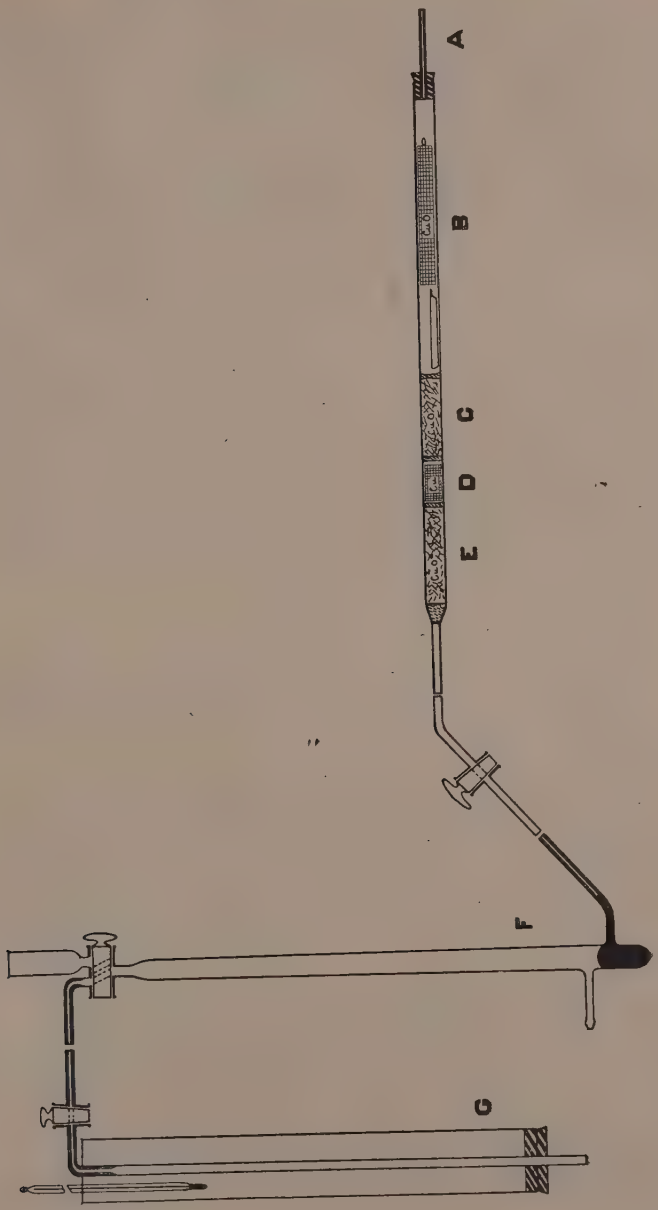
In case the carbon dioxide is found to be of sufficient purity, which is indicated by the minute size of the bubbles and the negligible quantity of gas collected during half an hour or so, while running the gas through at the rate of 8—10 bubbles in 10 seconds, the tube is heated while running carbon dioxide through, to remove absorbed air, and then cooled in the gas. Instead of leaving the oxidized copper spiral (B) in the tube considerable time is saved if 2 extra boats filled with freshly oxidized, powdered copper oxide are put in. The permanent tube filling is good for quite a number of determinations, while for some compounds the powdered copper oxide is so badly reduced on burning one sample that is must be reoxidized and placed in the tube to remove the adsorbed air before it can be used for burning another sample. Thus some time is saved by driving off the absorbed air from three boats full of powdered copper oxide at once.

After the tube filling has cooled in carbon dioxide the tube is opened by taking the stopper which carries the capillary tube (A) out of the combustion tube. Two boats containing copper oxide are set aside for future use, and into the third is placed about 20 milligrams of the substance to be analyzed, covered with powdered copper oxide and placed back into the combustion tube. Then the oxidized roll of copper gauze is put in and the generator connected. During this operation some air will, of course, enter the tube

which must be swept out by carbon dioxide before the tube or any part of it is heated. After the air is removed, which can be determined as above, it is let out through the three-way stop-cock on top of F, and heating of the tube filling is started.

For heating 3 Tirrill burners are used. One fitted with a wing top, under the reduced copper spiral, heating the reduced copper spiral, part of the layer of oxide in front and part of the layer back of it, is started first, then the burner under B, the oxidized copper spiral, is started. In case the substance requires a fairly high temperature for decomposition a wing top is used. The plates used for covering the tube are all taken off, except over the parts to be heated. After these parts have been heated gradually to nearly the full heat of the burner, the third burner under the sample is started, very low at first under the end of the oxidized copper spiral, and gradually raised and moved under the sample. At the same time the covers are gradually put on, but at no time should the bubbles rise faster than 8 per ten seconds, and for some compounds an even slower rate is advisable. During the first part of the heating some gas comes into the absorption tube, due to expansion on heating the tube, so the stop-cock between the generator and A may be left closed during the combustion and only the one between the combustion tube and the absorption tube kept open. If a compound decomposes readily, more care must be used in heating the tube filling and in decomposing the sample. The burner under the reduced copper spiral may, however, always be started with the wing top on. But the burner under the oxidized copper spiral will in some cases have to be started without the wing top and as faraway from the sample as possible. Then after the reduced copper spiral is hot, and also parts of both layers of copper oxide (wire form), the other burner is moved slightly towards the sample, and after a while the wing top may be put on. By this time the sample may have started to decompose and it may not be necessary to start the burner directly under the sample till the sample is practically decomposed. In either case the reduced copper spiral and part of the copper oxide in front of it as well as that in back of it should be hot and the oxidized copper gauze roll as hot as possible. If this is not hot, backward distillation will take place and low results follow.

After the sample is nearly all decomposed, the full heat of the burners will usually be used, and the covers will all have been put


A
B
E D C
F
G

on. When the evolution of nitrogen slows up, carbon dioxide from the generator is turned on, but also here the rate is of importance since sweeping too fast may give high results. After all the nitrogen has been swept out, which is indicated by the size of the bubbles, that is, if they are practically the same size as before starting the determination, the stop-cock between the combustion tube and the absorption tube is closed, while that between the generator and the combustion tube is left open.

The gas is now transferred from the absorption apparatus to the burette by opening the 3-way stop-cock, in the proper direction, also the stop-cock on the the capillary tube between it and the burette, and forcing the gas over by raising the levelling bulb attached to F, and lowering the one attached to G. The upper meniscus of the bubble is stopped at the zero mark, and the lower one read after about 15 minutes, to allow the potassium hydroxide solution to drain down the sides of the tube and the gas to attain the temperature of the water. The volume of gas is now read off from the curve, corresponding to the distance occupied by the gas, and the percent nitrogen calculated.

Results.

Using the above described method the following results were obtained:

Substance	Wt. of Sample in gms.	Vo. of N. in c,c.	Tem. °C	Bar mm.	%N Found	%N Calc.
Diphenyl Urea	0,0123	1,475	23	747,4	13,36	
	0,0202	2,360	23	748,6	13,04	
	0,0208	2,540	23,5	738,1	13,40	
	0,0124	1,475	23	738,7	13,11	
	0,0141	1,695	23	738,7	13,24	
					13,23	13,20
Dinitro Durene	0,0356	4,04	22	731,8	12,43	
	0,0171	1,94	23	740,5	12,50	
					12,47	12,50
Acetyl deriv. of Diamino Durene	0,0132	1,350	22,5	738,8	11,30	
	0,0148	1,525	23	739,6	11,36	
					11,33	11,29

Substance	Wt. of Sample in gms.	Vo. of N. in c. c.	Tem. °C	Bar. mm	%N Found	%N Calc.
Azobenzene	0,0140	1,960	24,5	741,6	15,37	
	0,0169	2,375	22,5	741,6	15,57	
					15,47	15,38
Diacetyl	0,0199	1,875	21,5	741,6	10,54	
Hydrazobenzene	0,0187	1,775	21,5	743,5	10,60	
					10,57	10,44
Dinitro Durylic Acid Bromide	0,0251	2,000	22	742,6	8,66	
	0,0180	1,463	24,5	732,5	8,82	
					8,74	8,83
Hydrazine Sulphate	0,0228	4,550	23,5	730,0	21,66	
	0,0166	3,305	23,75	730,0	21,60	
					21,63	21,52
O-acetotoluide	0,0197	1,662	23,5	743,3	9,33	
	0,0178	1,500	22,5	744,1	9,37	
	0,0192	1,675	22	734,1	9,58	
	0,0228	1,975	21,5	735,6	9,53	
					9,45	9,39
Uric Acid	0,0109	3,300	25	744,6	33,32	
	0,0112	3,325	22	743,9	33,10	
					33,21	33,31
Malondiamide	0,0158	3,825	20,5	754,1	27,52	
	0,0162	3,950	22	753,9	27,54	
					27,53	27,46
Hexamethylene-tetramine	0,0215	7,750	21,5	740,6	40,06	
	0,0202	7,725	24	739,1	39,98	
					40,02	39,95
P-Nitraniline	0,0186	3,45	23	734,4	20,31	
	0,1700	3,15	21,5	730,5	20,31	
					20,31	20,28
Benzoylalanine	0,0197	1,30	23,5	731,3	7,18	
	0,0188	1,24	23,5	743,6	7,29	
					7,24	7,25

Summary.

1. A semi-micro method based upon PREGL's excellent micro-method for the determination of nitrogen in organic compounds has been described.

2. The method yields results which compare favorably with the results obtained by the use of other methods in use at the present time.

An Adaptation of Pregl's Microcombustion to a Semi-microcombustion Method for the Determination of Carbon and Hydrogen.

By **Walter M. Lauer** and **Frank J. Dobrovolny.**

(Contribution from the School of Chemistry of the University of Minnesota.)

The methods of quantitative organic microanalysis as developed by FRITZ PREGL[1]) constitute one of the most valuable contributions to the field of organic analysis. In spite of this fact they have not received the attention in the United States which they deserve. This is perhaps largely due to the necessity of using a microbalance, if one wishes to use the amounts recommended by PREGL. For example, this investigator carries out a determination of carbon and hydrogen on a sample which weighs two milligrams. In order to avoid the use of a balance of this accuracy, WISE[2]) has developed a simple and neat modification of PREGL's[3]) earlier procedure for the determination of carbon and hydrogen. He has shown that if the analyst is content to use 12 to 22 milligrams samples for analysis, the weighings may be performed on a sensitive analytical balance.

During the prosecution of recent work[4]) several groups of substances were obtained which were exceedingly difficult to analyze by the ordinary methods of macrocombustion. The authors have accordingly devised a semimicrocombustion method which is a combination of the method of WISE and of the more recent method of PREGL, together with some modifications. It has been found to possess a number of advantages and has been used with considerable success in several laboratories.

---

[1]) Quantitative Organic Microanalysis. — PREGL. Translated by FYLEMAN: J. & A. Churchill, London.

[2]) J. A. C. S. *39*. 2055—68 (1917).

[3]) F. PREGL, in E. ABDERHALDEN's Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden. (i. i.) Vol. 5, 1307—56.

[4]) SMITH and DOBROVOLNY. J. A. C. S. *48*. 1693 (1926).

Description of Apparatus.

Drying Train and Pressure Regulator (A. B. and C in Fig.).

Oxygen from a high pressure tank fitted with a reducing valve is passed through A, an ordinary calcium chloride tube, which contains pieces of solid potassium hydroxide about the size of a pea. These are held in place by plugs of fine glass wool. A is connected to B, the pressure regulator, by means of a piece of "artificially-aged" rubber tubing[5]).

The pressure regulator, B, consists of a tube, about 20 cm. in length and 2 cm. in diameter with a small side-arm. A small tube (5—7 mm. outside diameter) is sealed through this larger tube in the manner indicated in the figure. This is then inserted into a large test-tube (about 16 cm. in length and 4 cm. in diameter) which contains sulfuric acid. The regulator is mounted in such a manner as to allow raising or lowering of this outer test-tube.

The bubble counter, which contains a small of sulfuric acid, together with the phosphorus pentoxide tube, is designated C in the figure. The bubble counter is about 1,5 cm. in diameter and the size of the opening in the inner tube is approximately 1 mm. in diameter. It is connected to the pressure regulator, B, with artificially aged rubber tubing and to the phosphorus pentoxide tube by means of a ground glass joint. The body of the phosphorus pentoxide tube is 1,5 cm. in diameter (outside) and the length avaible for filling with drying agent and glass wool is about 11 cms. This tube may be filled by first inserting a plug of fine glass wool, then alternating with layers of phosphorus pentoxide and thin layers of fine glass wool.

The drying train here described can be used for a large number of determination when ordinary tank oxygen is used. For example, the authors have used one drying train for about one hundred and fifty determinations without refilling.

The Combustion Tube (D and E in Figure).

The tube in which the combustion is carried out is Pyrex glass, 1,5 cm. in diameter (1,2 cm. inside diameter) and 40 cm. long.

[5]) All rubber tubing, which is referred to as being artificially aged, was heated at 100° C. in a drying oven for a period of several hours while air was aspirated through it with a water-pump. (See PREGL, Quantitative Organic Microanalysis, p. 17—18.)

The tip is 2 cm. in length with an outside diameter of 5 mm. (3 mm. inside diameter). It is filled according to the following method, which is due to WISE: "First, a pledget of fine glass wool, loosely packed into the constricted portion of the tube; second, a 2,5 cm. layer of asbestos treated with cupric oxide (prepared by impregnating acidwashed asbestos with a concentrated cupric nitrate solution, drying and carefully igniting), containing a few short lengths of cupric oxide wire; third, a 0,5 cm. layer of plain asbestos; fourth, a 1,5 cm. layer of platinized asbestos (prepared by immersing purified asbestos in 10% hydrochloroplatinic acid solution, drying and igniting): fifth, a 0,5 cm. layer of plain asbestos; sixth, a 3,5 cm. layer of asbestos treated with cupric oxide and mixed with cupric oxide wire; seventh, a 0,5 cm. layer of plain asbestos; eighth, a 1,5 cm. layer of platinized asbestos; and finally a 0,5 cm. layer of plain asbestos."

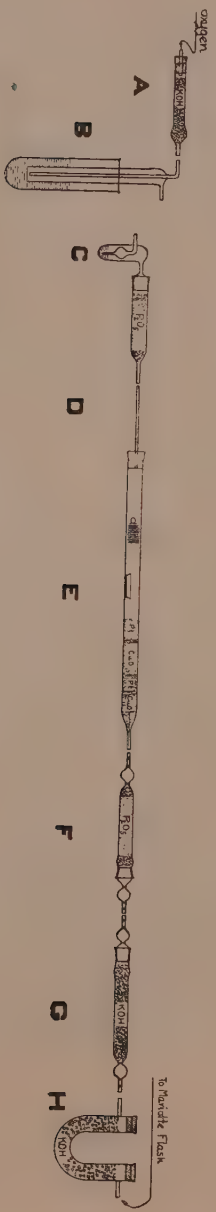
A fairly stout platinum wire is inserted into the small end of the tube. One end of this wire is flush with the tip of the tube, the other end extends well into the tube filling. In this way condensation of moisture in the tip of the tube is prevented. The authors also favor the use of an oxidized copper spiral (about 2 cm. in length), placed as indicated, especially with compounds which sublime very readily.

The combustion tube is joined to the drying train C through a piece of capillary glass tubing (12 cm. long with 0,5 mm. opening) by means of a piece of artificially aged rubber tubing and a rubber stopper.

It is supported by means of a piece of 90° angle iron, provided with a 3/8 inch iron side arm. This side arm is then attached to a ring stand by means of an ordinary clamp holder. Small covers about 2 inches long, fashioned out of 3/32 inch sheet iron, furnish covering for the tube during the combustion. This piece of angle iron may be slotted at several places so as to lessen heat transfer from one end of the tube to the other. The stand is lined with asbestos paper. Two Tirrill burners fitted with wing tops furnish heat for the combustion.

The Absorption Train (F, G and H in Figure).

The absorption train consists of two absorption tubes (F and G), a guard tube, H and a Mariotte flask. The two absorption tubes are constructed of thin glass tubing with an outside dia-


oxygen
KOH
A
B
C
D
E
F
G
H
To Manistie Flask
KOH

meter of 12 mm. The one end is provided with a small bulb about 12 mm. in diameter. This bulb connects with the body of the tube through a constriction with a 1 mm. opening. (The outside diameter of this constriction is approximately 5 mm.) The tip of the tube which is joined to this bulb consists of a piece of glass tubing 2,5 cm. in length with an opening of 3 mm. (5 mm. outside diameter). This tip is provided with two constrictions (1 mm. opening) placed about 1 cm. apart and as indicated in the figure.

The other end of the absorption tube is fitted with a well- constructed ground-glass joint. This ground-glass joint serves to connect the body of the tube with a 12 mm. bulb provided with a 2,5 cm. tip. The construction of this bulb and tip is the same at that specified for the end which is farthest removed from the ground-glass joint.

The two absorption tubes, (F and G) differ only in the length of the barrell. The phosphorus pentoxide tube, F, has a barrel 10 cm. in length, and the potassium hydroxide tube, G, is provided with a 13 cm. barrel.

The phosphorus pentoxide tube is filled in the following manner. A plug of fine glass wool is first inserted and pushed into place by means of a glass rod. Alternating thin layers of phosphorus pentoxide and glass wool are then introduced until the tube is filled. The last layer introduced should be glass wool and care must be taken to remove bits of glass wool from the ground surface of the tube. A minimum amount of a heavy stop-cock grease is used on this joint. All ground glass connections must be examined very carefuly and any grease which protrudes should, of course, be removed.

The potassium hydroxide tube, G, is filled in the following manner. A plug of fine glass wool is first introduced and pushed into place. Small pieces of potassium hydroxide about the size of flax-seed are then placed into the end of the tube. The tube is then filled with pieces of potassium hydroxide, the pieces gradually becoming larger and larger until finally, the last three or four centimeters of the barrel are filled with pieces about the size of a pea or even a trifle larger. Finally a piece of fine glass wool is introduced to hold the potassium hydroxide in place. The ground surface of the glass joint is cleaned. A heavy stop-cock grease is also used on this joint.

Phosphorus pentoxide and potassium hydroxide tubes prepared

in this manner can be used for about twenty determinations without recharging. Care must be exercised in the filling of the potassium hydroxide tube or else the tube will become clogged after a small amount of carbon dioxide has been absorbed. For this reason it is important that relatively coarse pieces of the absorbent be used in the end of the tube which is directed towards the combustion tube. After the analyst has once learned how to fill these tubes, this difficulty will disappear.

The guard tube, H, is a small U-tube filled with pieces of potassium hydroxide about the size of a pea. This filling is held in place with glass wool. Ordinary rubber stoppers close the ends of the U-tube.

The Mariotte flask consists of a large aspirating bottle of about 2 l. capacity. The neck of the top of this bottle is fitted with a two-holed rubber stopper. This stopper carries an ordinary stop-cock extending a short distance through the stopper and a glass tube extending to within about one inch of the bottom of the aspirating bottle. This glass tube is connected to the one side of the guard tube H by means of a piece of rubber tubing. The outlet of the aspirating bottle is fitted with a well-fitting cork stopper, which carries a piece of glass tubing. This glass tubing extends several inches into the aspirating bottle and after passing through the cork stopper bends at 90° and passes up along side of the aspirating bottle to the top.

The rubber connections.

The rubber tubing for the connections between (a) the combustion tube, E and the phosphorus pentoxide tube F, (b) the phosphorus pentoxide tube, F and the potassium hydroxide tube, G and (c) the potassium hydroxide tube, G and the guard tube, H, is impregnated. For connection (a) the impregnating material is paraffin, while in the cases of (b) and (c) vaseline is used. This simple operation is carried out as follows: The tubing (thick-walled) is cut into lengths of 2—2,5 cm. These are placed in a suitable flask and covered with molten vaseline or paraffin, as the case may be. The flask is then connected with a vacuum pump. After about 20 minutes no more bubbles will arise from the pieces of rubber tubing. They are then brought to atmospheric pressure. After most of the impregnating material has been allowed to drain off, the openings in the pieces of tubing are cleaned out with a

small cloth moistened with glycerine, and finally with a dry cloth.

The rubber tubing which is used to cap the absorption tubes is cleaned with a glass rod moistened with glycerine and then wiped dry with a cloth.

Detailed Procedure.

"Burning out" the Combustion Tube. The combustion tube is heated by means of two Tirrill burners, which have been provided with fish-tails, while a slow stream of oxygen is passed through the tube. The analyst should satisfy himself that the tube has been completely "burned out" by running a blank determination. The details of the procedure for a blank determination are similar to those of an actual determination and therefore are not enumerated separately.

Weighing Absorption Tubes and Sample. During the time required for "burning out" the combustion tube, the absorption tubes and the sample are weighed. These weighings are performed as follows: The capped absorptions tubes are wiped with a cloth moistened with water until they are perfectly clean. They are then wiped with a dry cloth and allowed to stand near the balance for a period of about twenty minutes. A rack fashioned out of aluminum wire serves as a convenient method of support for the absorption tubes. After twenty minutes have elapsed, the caps are removed and the tubes are carefully transferred to the balance pan. A small cradle constructed of aluminum wire supports the tube on the balance pan. The tube is then weighed to the nearest 0,05 mgm.

The sample is weighed into a small boat. (The authors have used a boat constructed of platinum foil. In the case of some substances, e. g. ozonides, a porcelain boat was prefered on account if its lower thermal conductivity). A sample of about twenty milligrams is used. Here again, the weighings are made to the nearest 0,05 mgm.

The Combustion Proper. During the latter part of the procedure described under the weighings the burner nearest the bubble counter is turned off. After the end of the tube has cooled sufficiently the absorption train is connected to the combustion tube, the drying train is disconnected from the combustion tube, the oxidized copper spiral is removed by means of a suitable hook and the boat containing the sample is introduced. The oxi-

dized copper spiral is replaced, the drying train is connected to the combustion tube, and the water is started to flow drop-wise from the Mariotte flask into a graduate. The operations are carried out in this order and without delay. The burner which was turned off is now lighted, after removing fish-tail, and placed under the copper spiral. The burner nearest the absorption train has been allowed to burn continuously during these operations. The heating of the sample is carried out in such a manner as to require about 15 minutes for its oxidation. The fish-tail is then placed on the burner nearest the drying train and the heating continued until the boat has been burned clean, at which time this burner is turned off. Experience soon enables the operator to control the rate of combustion. Any moisture which may have collected in the end of the phosphorus pentoxide tube is removed by grasping this end between the warm prongs of a pair of crucible tongs. About 100 cc. of oxygen is then aspirated through the apparatus to sweep out the last amounts of carbon dioxide and water. The flow of water from the Mariotte flask is then discontinued, and the absorption train is disconnected from the combustion tube.

The experienced analyst will have a second pair of weighed absorption tubes and a second sample available at this time, for the apparatus is now ready for another combustion.

The absorption tubes which were used for the first sample are then attached to a second potassium hydroxide guard tube and Mariotte flask. Air which has been passed through a purfying train containing phosphorus pentoxide and potassium hydroxide is then aspirated through the absorption tubes in order to displace the oxygen. About one hundred cc. of air suffices for this purpose. Instead of this procedure the analyst may find it preferable to fill the absorption tubes with oxygen before their first weight is taken. The tubes are then capped, wiped and finally after standing for about twenty minutes are weighed in the manner previously described.

With a little experience, it is possible to carry out seven or eight analyses in an eight hour day. Furthermore, the results obtained by students, who were unfamiliar with both this method and that of macro-combustion, have convinced the authors that the technique of the method here described is acquired more easily than that of the macro-combustion. This is most probably due to the accurate control of the combustion which is afforded by the

use of the oxygen pressure regulator and the Mariotte flask. The adaption of these two devises for this purpose is due to the ex cellent work of PREGL.

Results.

The following typical analyses were carried out using the above procedure. The substances analyzed, which contained only carbon, hydrogen and oxygen, were materials obtained from different sources and no attempt at further purification was made.

This method can be extended to include compounds which contain other elements, by making suitable changes in the tube filling.

Table I.

Substance analyzed	Found %H	Found %C	Calc. %H	Calc. %C
Vanillin	5,3	63,2	5,30	63,13
	5,4	63,5		
	5,3	63.2		
Salicylic Acid	4,6	60,7	4,38	60,86
	4,5	60,7		
Benzoic Acid	5,0	68,8	4,95	68,82
	5,0	68,7		
Anthraquinone	4,0	80,4	3,88	80,75
	3,9	80,5		
	3,8	80,5		
Duroquinone	7,4	73,1	7,37	73,12
	7,5	73,2		
	7,5	73,2		
	7,5	72,9		
Resorcinol	5,6	65,2	5,50	65,42
Mannitol	7,6	39,7	7,75	39,54
	7,8	39,7		
Anisic Acid	5,3	62,8	5,30	63,13
	5,4	62,8		
Benzalacetophenone	5,9	86,7	5,81	86,50
	5,8	86,5		
Hydroduroquinone	8,6	72,2	8,50	72,25

Summary.

1. A semi-microcombustion method for the determination of carbon and hydrogen, which is a combination of the method of WISE, of the more recent method of PREGL, together with some modifications, has been described.

2. The results obtained by its use in the case of compounds containing only carbon, hydrogen and oxgen are as satisfactory as those obtained by the methods of micro-combustion, and they are more conveniently obtained.

Mikrorespirationsapparat zur gleichzeitigen Bestimmung von O_2 und CO_2.

Von **J. Frhrn. v. Ledebur.**

(Aus d. physiolog. Institut d. Universität Breslau, Vorst. Prof. WINTERSTEIN.)

(Eingelangt am 22. Mai 1929.)

Die für die Atmungsmessung überlebender Organe benutzten Mikrorespirationsapparate ähneln sich, was die Messung des geatmeten Sauerstoffes betrifft. Als Grundprinzip kommt eigentlich nur die volumetrische Gasmessung dabei in Betracht. Die für diese Zwecke fast ausschließlich benutzten Apparate, das THUNBERG-WINTERSTEIN'sche Mikrorespirometer[1]) und der WARBURG'sche Apparat[2]), unterscheiden sich nur durch die Art und Weise der Kompensierung von Temperatur und Barometerstandsänderungen während des Versuches. Die mit beiden erzielbare Genauigkeit beträgt maximal etwa 0,5 bis 0,2 cmm O_2.

Anders ist es bei der Bestimmung der Kohlensäure. Hier ist die Zahl der beschriebenen Apparate fast ebenso groß wie die Zahl der dabei verwendeten Prinzipien. Diese Tatsache und die verhältnismäßig große Zahl der beschriebenen Methoden zeigen schon, daß es nicht ganz leicht ist, Kohlensäure mit ausreichender Genauigkeit und mit verhältnismäßig einfachen Methoden zu bestimmen.

TASHIRO[3]) beobachtete bei seinem Biometer mit der Lupe die Trübung, die ein CO_2haltiges Gasgemisch in einem Tröpfchen $Ba(OH)_2$ durch ausfallendes Karbonat hervorruft, und konnte so CO_2-Mengen bis zu $1 \cdot 10^{-7}$ g (also etwa = 0,05 cmm) bestimmen. Ob diese allerdings überraschende Genauigkeit mit dieser Methode zu erreichen ist, wird von manchen Seiten angezweifelt. Dabei ist aber zu beachten, daß die von TASHIRO angestellten Kontrollversuche gut übereinstimmten und auch die mit dieser Methode gefundenen Resultate in gutem Einklang mit Ergebnissen stehen, die mit anderen Methoden gefunden wurden. — Die Kohlensäure

---

[1]) WINTERSTEIN. Ztschr. biol. Techn. u. Meth. III. 246 (1913).

[2]) WARBURG. Biochem. Ztschr. 142. 317 (1923); Biochem. Ztschr. 152 51 (1924).

[3]) TASHIRO. Amer. J. Physiol. 32. 137 (1913).

als Säure wurde von HAAS[4]), MOORE[5]), OSTERHOUT[6]), IRWIN[7]) und später von PARKER[8]) mit Hilfe einer Indikatormethode bestimmt, indem die Zeit zwischen dem Farbumschlag von pH 7,8 bis zu pH 7,4 der Indikatorlösung (Phenolsulfphtaleïn) gemessen wurde.

Während bei HAAS und MOORE das atmende Gewebe in der mit dem Indikator versehenen Ringerlösung sich befand, so daß also auch andere ausgeschiedene fixe Säuren an dem Farbumschlag beteiligt sein konnten, befand sich bei den letzteren Autoren das atmende Gewebe außerhalb der Flüssigkeit. Die gebildete Kohlensäure wurde durch Durchperlenlassen (OSTERHOUT, IRWIN) oder durch Schütteln (PARKER) in der darunter befindlichen 0,0001 n Natriumbikarbonatlösung, die den Indikator enthielt, zur Absorption gebracht. PARKER gibt an, mit dieser etwas veränderten Methode eine Genauigkeit von 0,001 mg (also etwa 0,5 cmm) CO_2 erreicht zu haben. In seiner letzten Arbeit[9]) mußte von PARKER die früher angegebene Berechnung der Kohlensäure aus dem Farbumschlag fallengelassen und die früher berechneten Werte mußten auf Grund von direkten Messungen experimentell eingeführter CO_2-Mengen auf ein Viertel ihres Wertes reduziert werden. Da eine Erklärung für diese Abweichung von der Berechnung nicht vorliegt, ferner die genaue Beurteilung des Farbumschlages auf ziemlich erhebliche Schwierigkeiten stößt, scheint es fraglich, ob man mit dieser Methode die angegebene Genauigkeit zuverlässig erreichen kann, zum mindesten ist uns dies in eigenen Versuchen nicht gelungen.

Auch mit den oben erwähnten volumetrischen Mikrorespirationsapparaten kann die Kohlensäure gemessen werden.

So bestimmte GERARD[10]) die Kohlensäure in einer etwas modifizierten WARBURG'schen Apparatur manometrisch, indem er die während des Versuches gebildete und an Kalilauge gebundene Kohlensäure nach dem Versuch durch HCl austrieb. Eine sehr

[4]) HAAS. Science. 44. 105 (1916).
[5]) MOORE. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 15 (1917); Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 16 (1918); J. Gen. Physiol. 1. 613 (1919).
[6]) OSTERHOUT. J. Gen. Physiol. 1. 17.
[7]) IRWIN. J. Gen. Physiol. 3. 689 (1920/21).
[8]) PARKER. J. Gen. Physiol. 7. 641 (1925).
[9]) PARKER. Amer. J. Physiol. 86. 440 (1928).
[10]) GERARD. Amer. J. Physiol. 82. 381 (1927).

große Genauigkeit ist dabei nur schwer zu erreichen wegen der Schwierigkeit der exakten Austreibung aus der Lauge, außerdem besteht aber die Umständlichkeit, daß immer in einem Kontrollgefäß vor dem Versuch die praeformierte Kohlensäure aus der Kalilauge ausgetrieben und gemessen werden muß.

Ferner kann die Kohlensäure volumetrisch durch Berechnung bestimmt werden, indem zuerst die O_2-Atmung, dann nach Weglassen der die CO_2 absorbierenden Kalilauge die Differenz zwischen CO_2-Abgabe und O_2-Aufnahme gemessen wird, und aus beiden dann die gebildete Kohlensäure berechnet wird.

Mikrotitrimetrische Methoden der CO_2-Bestimmung, wobei eine Bindung der Kohlensäure an Bariumhydroxydlösungen von bestimmter Konzentration und Rücktitration derselben mit verdünnten Normalsäuren stattfindet, sind von KROGH-REHBERG[11]) (modifiziert von RAFFEL[12]) und von v. LEDEBUR[13]) angegeben worden. Die gebildete CO_2 wird dabei dauernd durch einen CO_2freien Gasstrom aus dem Atmungsgefäß durch Barytlauge geleitet. Die dabei erreichte Genauigkeit betrug bei RAFFEL 1,1 bis 5,5 cmm CO_2 bei Mengen von 0,1 bis 0,5 ccm CO_2, bei v. LEDEBUR etwa 1,0 cmm CO_2.

Alle die bisher beschriebenen Methoden mit ihrer mehr oder weniger großen Genauigkeit und Zuverlässigkeit haben den großen Nachteil, daß die gebildete CO_2 nicht gleichzeitig mit dem verbrauchten O_2 gemessen werden kann, was für sehr viele Gaswechselunternehmungen von großer Wichtigkeit ist. In neuerer Zeit sind nun einige Apparate angegeben worden, die die gleichzeitige CO_2- und O_2-Messung gestatten.

SLATER[14]) bestimmte den verbrauchten O_2 volumetrisch, die CO_2 elektrisch mit Hilfe eines Katharometers, dessen Prinzip (vgl. DAYNES[15]) darauf beruht, daß sich der, mit der WHEATSTONEschen Brücke gemessene, elektrische Widerstand einer Platinspirale durch Veränderungen der umgebenden Atmosphäre verändert. Ein Wechsel von 0,01% CO_2 ist dabei noch sehr leicht feststellbar. (Die Grenze ist etwa 0,001%.) Bei einem Volumen der Respirationskammer von 10 ccm würde das eine Genauigkeit von 1,0 cmm

[11]) KROGH-REHBERG. Skan. Arch. 49. 167 (1926).
[12]) RAFFEL. J. of Biol. Chem. 74. 839 (1927).
[13]) v. LEDEBUR. Pflüger. Arch. 217. 235 (1927).
[14]) SLATER. J. of scient. Instr. III. 177 (1926).
[15]) DAYNES. Proc. of the Royal Soc. of L. A. XCVII. (1920.)

(Grenze etwa 0.1 cmm) CO_2 entsprechen. Die für die Ablesungen nötige Temperaturkonstanz beträgt 0,2°.

Die in der Technik schon bekannte Methode der CO_2-Bestimmung durch Absorption in $Ba(OH)_2$ und Messung der Leitfähigkeitsänderung dieser Lösung (vgl. CAIN und MAXWELL[16]) wurde von SPOEHR und MC. GEE[17]) in die biologischen Arbeitsmethoden eingeführt und von RAYMOND und WINEGARDEN[18]) und von FENN[19]) dann weiter ausgearbeitet.

Letzterer[20]) verband dann später die Leitfähigkeitsmethode mit der O_2-Bestimmung in einem modifizierten THUNBERG-WINTERSTEIN'schen Mikrorespirometer, indem er die Kalilauge der Respirationskammer durch $Ba(OH)_2$ ersetzte und deren Leitfähigkeitsänderung maß.

Die Empfindlichkeit der O_2-Messung vergrößerte er durch Verengerung der das Atmungs- und das Ausgleichsgefäß verbindenden Indexkapillare bis zu einer Genauigkeit von 0,03 cmm. Nach unseren Erfahrungen an dem WINTERSTEIN'schen Respirometer muß die Möglichkeit einer Vergrößerung der Genauigkeit auf diese Weise bezweifelt werden. Die unerklärlichen Eigenwanderungen des Indextropfens, die auch bei den gewöhnlichen Apparaten mit einer Indexkapillaren von etwa 1 mm Durchmesser vorhanden sind, aber dort in die Fehlerbreite der Apparatur fallen, werden durch Verengerung der Kapillaren so verstärkt, daß sich keine wesentliche Verfeinerung der Methode damit erzielen ließ. Die Genauigkeit der CO_2-Bestimmung wird von FENN mit 0,044 cmm angegeben; allerdings soll dazu eine Temperaturkonstanz von 0,001° erforderlich sein, über deren Erzielung keine genauen Angaben gemacht werden.

Es schien uns daher wichtig, einen Mikrorespirationsapparat zur gleichzeitigen Ablesung von O_2 und CO_2 zu konstruieren mit einer nach unseren Erfahrungen zuverlässig erreichbaren Genauigkeit von allerdings nur 0,5 bis 1,0 cmm, die wohl für die meisten Mikrogaswechseluntersuchungen ausreicht. Dabei hielten wir es für nötig, die Grundlagen der Leitfähigkeitsbestimmung der Kohlensäure einer experimentellen Nachprüfung zu unterziehen.

---

[16]) CAIN, MAXWELL. J. of Industr. a. Engin. Chem. 11. 852 (1919).
[17]) SPOEHR u. MC. GEE. J. of Industr. a. Engin. Chem. 16. 128 (1924).
[18]) RAYMOND, WINEGARDEN. J. of biol. Chem. 74. 189 (1927).
[19]) FENN. Proc. of the Soc. f. exp. biol. a. med. 23. 714 (1926).
[20]) FENN. Amer. J. of Physiol. 84. 110 (1928).

Ausgegangen wurde beim Bau der Apparatur von einem WINTERSTEIN'schen Mikrorespirationsapparat[21]), aus Atmungskammer und Kompensationsgefäß, beide durch die Indexkapillare verbunden, und dem an der Seite des Atmungsgefäßes sich befindenden Manometer bestehend. Dieses Atmungsgefäß besaß etwa einen Rauminhalt von 20 ccm. Für die CO_2-Messung wurde es folgendermaßen geändert:

Die Elektroden wurden nicht in dem Boden des Gefäßes eingeschmolzen, da eine Reinigung des Apparats ohne Verschiebung der Elektroden und infolgedessen ohne Veränderung der Widerstandskapazität des Gefäßes sonst nicht möglich gewesen wäre. Sie wurden vielmehr mittels langer Glasstäbe an dem Glasstopfen des Gefäßes befestigt. Die Elektroden bestanden zum Schutze gegen auch noch so kleine Verschiebungen gegeneinander aus 1 mm dickem Platinblech und waren direkt (ohne Drahtverbindung) in den Halteglasstäben eingeschmolzen. Sie hatten rechteckige Form (10×5 mm) und waren so gebogen, daß sie der zylindrischen Wandung des Leitfähigkeitsgefäßes fast anlagen. Dieses war ein kleiner, becherförmiger Ansatz von 12 mm Höhe und 20 mm Durchmesser unten am Atmungsgefäß, der, wie die gesamte Apparatur aus Jenaer Glas, wegen dessen geringer Abgabe von löslichen Stoffen bestand und zur Aufnahme der Barytlauge diente. Die Elektroden saßen bei fest eingedrehtem Schliff dicht über dem Boden dieses Bechers, der mit 3 ccm der Barytlauge gerade gefüllt war. Es wurde so erreicht, daß die Lauge eine möglichst große Oberfläche für die CO_2-Absorption besaß, anderseits die Elektroden noch von einer Laugenschicht von mehr als 5 mm Höhe bedeckt waren. Bei geringerer Höhe der bedeckenden Flüssigkeitsschicht genügte nämlich schon ein geringes Schrägstellen oder Schütteln des Apparats, um den Widerstand zwischen den Elektroden merklich zu ändern (infolge der Veränderung der Stromlinien oberhalb der Elektroden).

Die Elektroden wurden nur ganz wenig platiniert, wie es gerade für ein deutliches Tonminimum nötig war. Stärkere Platinierung war wegen der Gefahr der Adsorption, die besonders bei so stark verdünnten Laugen eine nicht unbeträchtliche Rolle spielt, nicht möglich.

Der ganze Mikrorespirationsapparat wurde dauernd in einem

[21]) WINTERSTEIN. S. o.

Wasserbade geschüttelt. Die Temperatur wurde auf 18° C mit einer Genauigkeit von 0,05° gehalten, und zwar durch eine zweifache Regulation, nämlich einen großen Toluol-Gasregulator für die Heizung und einen Toluol-Wasserregulator (in OSTWALD-LUTHER[22]) angegeben), der eine Kühlung des Wasserbades durch kaltes Leitungswasser regulierte, da während eines großen Teiles des Tages die Zimmertemperatur höher als 18° war.

Messung der Leitfähigkeit.

Die Messung geschah mit Hilfe einer KOHLRAUSCH-Brücke durch Bestimmung des Tonminimums mit dem Telephon. Die dabei verwendeten Abänderungen der Schaltung seien in folgendem beschrieben.

Als Wechselstromquelle wurde wegen seiner Unzuverlässigkeit und des störenden Geräusches kein Induktorium, sondern eine einfache Glimmlampenschaltung verwendet. (Für die Unterstützung beim Aufstellen dieses Schaltungsschemas bin ich Herrn Privatdozent Dr. Ing. BÜGE vom Elektrotechnischen Institut der Technischen Hochschule Breslau zu großem Dank verpflichtet.)

Parallel zu einer Glimmlampe Gl, deren im Gewinde befindlicher Vorschaltwiderstand entfernt worden war, wurde ein Kondensator K von etwa 0,5 Mikrofarad geschaltet. Nach Zwischenschaltung einer Verstärkerröhre R (Tel. R. E. 352), die als durch verschieden starke Heizung variabler Widerstand diente, wurde die Glimmlampe an das Gleichstrom-Stadtnetz von 220 Volt angeschlossen. Durch Variation des Kondensators oder der Röhrenheizung konnte eine beliebige Schwingungszahl der Kondensatorentladungen durch die Glimmlampe erreicht werden. Die Koppelung an die Brücke geschah mittels eines Induktionsapparats, dessen sekundäre Spule S_2 in den Glimmlampenkreis, die primäre S_1 in den Brückenkreis geschaltet wurde.

Zur Verstärkung diente ein Zweiröhren-Niederfrequenzverstärker V (Siemens-Halske R f v l), dessen Gitterspannung mit dem 0-Pol verbunden war. Zur Ausgleichung der Blindkapazitäten in den Brückenzweigen, die für ein gutes Tonminimum äußerst störend sein können, wurden parallel zu dem Vergleichswiderstandskasten R ein Drehkondensator C_1 von 1000 cm und parallel zu dem Widerstandsgefäß W ein Blockkondensator C_2 von

[22]) OSTWALD-LUTHER. Phys.-Chem. Messungen. 4. Aufl. S. 132.

1000 cm geschaltet. Durch kleine Veränderungen dieser Ausgleichskapazitäten konnte ein äußerst scharfes Tonminimum erreicht werden. Fig. 1 zeigt ein Schaltungsschema dieser Leitfähigkeitsapparatur.

Schema der Leitfähigkeitsbestimmung.

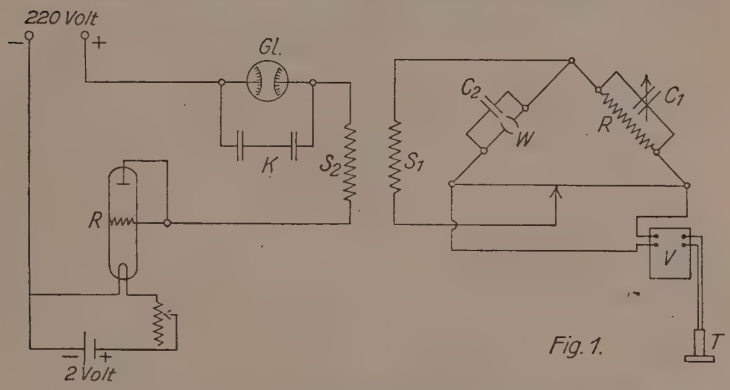


Fig. 1.

Die zur Absorption benutzte Barytlauge wurde in einer größeren, gut ausparaffinierten Vorratsflasche aufbewahrt. Sie wurde aus analysenreinem Bariumhydrat und Leitfähigkeitswasser hergestellt. Durch Einleiten von ein wenig gut gewaschener Kohlensäure wurde sie mit Bariumkarbonat gesättigt. Durch Sauerstoffüberdruck konnte aus der Vorratsflasche eine Normalpipette gefüllt werden, deren Inhalt dann sorgfältig in das Leitfähigkeitsgefäß gelassen wurde. Es wurden bei den Versuchen immer 3 ccm Barytlauge verwendet.

Da die Widerstandsänderung einer Barytlauge nicht linear mit der Konzentrationsänderung verläuft, und da die Genauigkeit der Ablesung am größten ist bei großen Widerstandsänderungen, können für eine Mikro-Kohlensäuremessung durch Leitfähigkeit nur solche Barytkonzentrationen benutzt werden, die bei einem gegebenen Konzentrationswechsel einen möglichst großen Widerstandswechsel ergeben. Die von Cain und Maxwell[23]) aufgestellte Widerstandskonzentrationskurve von $Ba(OH)_2$ beginnt etwa bei einer Konzentration von 0,1 n steil zu werden, und zwar wächst die Steilheit mit der Verdünnung, das heißt mit zunehmender Ver-

[23]) Cain-Maxwell. S. o.

dünnung nimmt bei einem gleich groß bleibenden Konzentrationswechsel die Änderung des Widerstandes beträchtlich zu. Von SPOEHR und MC. GEE[24]) wurden daher Konzentrationen von 0,1 bis 0,9 n benutzt. RAYMOND und WINEGARDEN[25]) gebrauchten eine Konzentration von 0,065 bis 0,12 n, und FENN[26]) schließlich eine solche von etwa 0,012 n. In den vorliegenden Bestimmungen wurde eine etwa ebenso verdünnte Lösung benutzt.

Da jedoch von diesen niedrigen Konzentrationen nur sehr wenige experimentelle Daten für eine derartige Kurve, die zur Berechnung der absorbierten Kohlensäure unbedingt notwendig ist, vorhanden sind, nämlich nur drei Daten in LANDOLT-BÖRNSTEIN[27]), aus denen FENN durch Rechnung seine Kurve aufgestellt hat, wurden zunächst einige Leitfähigkeitsbestimmungen an verdünnten Barytlaugen angestellt. Und zwar wurde eine Barytlösung in einer gut mit Natronkalkröhren gegen Luft abgeschlossenen größeren Flasche allmählich mit Leitfähigkeitswasser verdünnt. Vor und nach jeder Leitfähigkeitsbestimmung wurden je zwei gleiche Proben unter sorgfältigem Luftabschluß mittels einer Mikrobürette mit n 50 HCl titriert. Die so gefundenen Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Spezifische Leitfähigkeit verschiedener $Ba(OH)_2$-Konzentrationen.

n	$x \cdot 10^{-4}$
0,0124	25,41
0,0109	22,46
0,00968	20,07
0,00809	17,33
0,00685	14,45
0,00576	12,25
0,00495	10,64

Die Temperatur betrug bei diesen Versuchen 18,40° C und nicht 18,00, wie sich leider erst hinterher bei Vergleichung des benutzten Thermometers mit einem Normalthermometer ergab. Die Werte sind daher alle etwas zu hoch. Verbindet man nun die im LANDOLT-

[24]) SPOEHR u. MC. GEE. S. o.
[25]) RAYMOND u. WINEGARDEN. S. o.
[26]) FENN. S. o.
[27]) LANDOLT-BÖRNSTEIN. Phys. Chem. Tab. 1. Erg.-Bd. S. 603.

BÖRNSTEIN angegebenen und in dies Gebiet fallenden Leitfähigkeitswerte von Barytlauge (die Kurve verläuft bei diesen Ver-

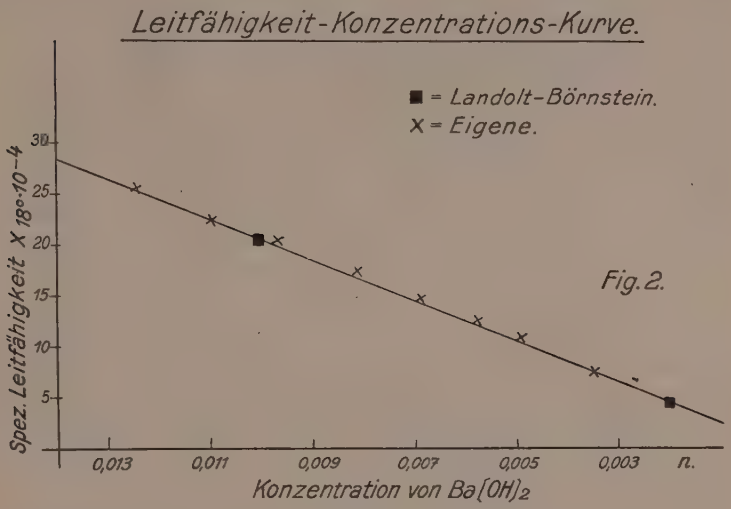


Fig. 2.

dünnungsgraden und in diesem kurzen Intervall annähernd gerade), und zwar für

$$n = 0{,}002 \ldots \ldots \ldots x_{18^\circ} = 4{,}3 \cdot 10^{-4}$$

$$n = 0{,}001 \ldots \ldots \ldots x_{18^\circ} = 20{,}7 \cdot 10^{-4}$$

$$n = 0{,}05 \ldots \ldots \ldots x_{18^\circ} = 95{,}6 \cdot 10^{-4}$$

und trägt die oben gefundenen Werte ein, so fallen sie annähernd auf diese gerade Verbindungslinie (s. Fig. 2). Wegen der zu hohen Temperatur bei den Versuchen liegen sie alle etwas zu hoch.

Diese Kurve wurde dann zur Berechnung der absorbierten Kohlensäure aus den abgelesenen Leitfähigkeitsänderungen der im Apparat befindlichen 3 ccm Barytlauge benutzt.

Eichung der Apparatur.

Es wurde nun untersucht, ob eine bestimmte, in den Apparat eingeführte CO_2-Menge eine der eben beschriebenen Leitfähigkeitskurve für $Ba(OH)_2$ entsprechende Leitfähigkeitsänderung hervor-

ruft. Zu diesem Zweck war es wegen der, wenn auch nur geringen Löslichkeit von $BaCO_3$ doch nötig, die Barytlauge, wie oben erwähnt, mit Bariumkarbonat vorher zu sättigen. Zuerst wurde versucht, CO_2 mittels einer Mikropipette durch Heben von Quecksilber in das mit reinem Sauerstoff gefüllte Atmungsgefäß zu drücken. Es ließen sich auf diese Weise jedoch keine exakten Werte gewinnen. Die Differenzen zwischen den hineingedrückten und den aus der Leitfähigkeitsänderung mit Hilfe der Kurve gefundenen Werten betrugen 3 bis 4%. Da die berechneten Werte einmal zu groß, ein andermal zu klein waren, mußte angenommen werden, daß die Fehler an der Unmöglichkeit lagen, ein genau abgemessenes Quantum von wenigen cmm CO_2 in den Apparat zu bringen.

Es wurde daher ein anderer Weg zur Eichung beschritten, indem in der Atmungskammer selbst aus einer genauen n/100 Na_2CO_3-Lösung durch Salzsäure eine bestimmte Menge Kohlensäure freigemacht wurde. Eine genau abgemessene Karbonatmenge wurde in ein Schälchen des Atmungsgefäßes gebracht, das mit CO_2-freiem Gas gefüllt und zum Temperaturausgleich etwa ein halbe Stunde im Wasserbade geschüttelt wurde. Dann wurde durch eine im Stopfen befindliche Öffnung, die durch Drehen des Schliffes freigegeben werden konnte, mit einer feinen, etwas abgebogenen Pipette ein Tropfen HCl in das Schälchen gebracht und der Apparat nach Verschluß des Stopfen-Loches wieder geschüttelt. Es konnte so festgestellt werden, daß die Leitfähigkeitsänderung durch die freigemachte Kohlensäuremenge gut mit der auf der Kurve berechneten übereinstimmte. So entsprachen

58,9 cmm entwickelter CO_2 58,7 cmm nach der Berechnung, oder
55,6 cmm entwickelter CO_2 55,7 cmm nach der Berechnung, oder
55,6 cmm entwickelter CO_2 55,5 cmm nach der Berechnung.

Diese Eichungsversuche ermöglichten es ferner durch alle fünf Minuten erfolgende Ablesungen, die Absorptionsgeschwindigkeit der Kohlensäure durch die doch recht schwache Barytlauge zu bestimmen. Es stellte sich dabei heraus, daß diese Geschwindigkeit bei gleichbleibendem Schütteln des Apparats (etwa 50- bis 70mal in einer Minute) je nach der im Apparat befindlichen Kohlensäuremenge variierte. Bei kleineren CO_2-Mengen von 9 bis 20 cmm war in 20 Minuten 92 bis 95%, in 30 Minuten 99 bis 100% absorbiert. Bei größeren Kohlensäuremengen von 50 und mehr cmm dauerte es etwas länger, hier waren nach 20 Minuten

etwa 85%, nach 30 Minuten 92 bis 95% und erst nach 40 Minuten 99 bis 100% absorbiert. Die Fig. 3 zeigt den verschiedenen Verlauf derartiger Absorptionszeitkurven von verschiedenen CO_2-Mengen.

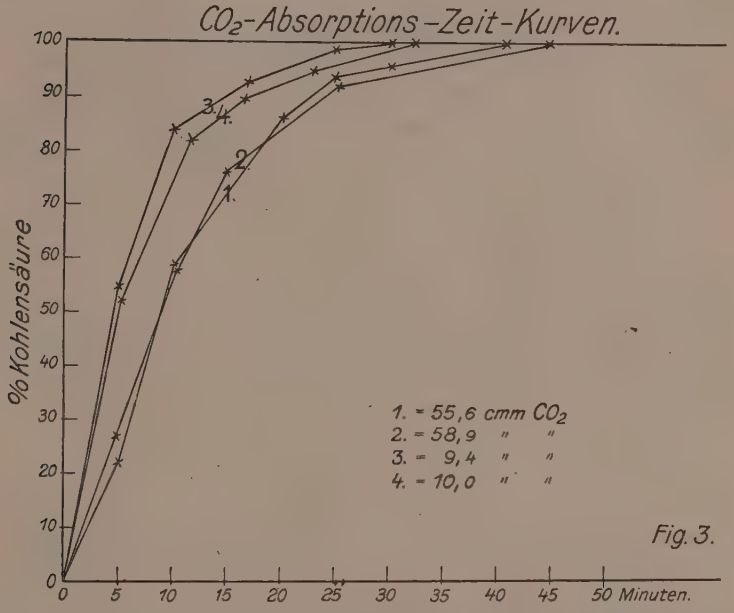


Fig. 3.

Eine Erklärung dieser verschieden schnellen Absorption gibt vielleicht die Tatsache, daß sich besonders beim Einführen größerer CO_2-Mengen auf der Barytlauge eine zusammenhängende Schicht von Bariumkarbonat bildete, die erst nach längerem Schütteln zu Boden sank und eine Verzögerung der Absorption bewirken konnte.

Bei Atmungsversuchen an überlebenden Organen spielt diese langsame Absorption keine besonders ungünstige Rolle, denn es werden dabei nicht plötzlich, sondern dauernd kleine CO_2-Mengen abgegeben. Trotzdem ist es wohl nicht angebracht, öftere Ablesungen als alle halbe Stunde zu machen, besonders nach Veränderung der Versuchsbedingungen. Und zwar sowohl Ablesungen des Sauerstoffes wie der Kohlensäure, denn auch die O_2-Ablesungen werden ja durch die Unvollständigkeit der Kohlensäureabsorption beeinflußt.

Der Einfluß von Temperaturänderungen auf die Leitfähigkeit und damit auf die Genauigkeit der Apparatur wurde in der Weise geprüft, daß der Widerstand in ein und derselben Barytlösung bei zwei verschiedenen Temperaturen gemessen wurde. Es ergab sich so z. B. eine spezifische Leitfähigkeit

$$x = 9{,}067.10^{-4} \text{ bei } 12{,}60^{\circ} \text{ C und}$$
$$x = 10{,}136.10^{-4} \text{ bei } 18{,}00^{\circ} \text{ C}$$

also bei einer Temperaturdifferenz von 5,4° eine Leitfähigkeitsänderung von $1{,}069.10^{-4}$. Oder bei einem anderen Versuch eine Änderung der Leitfähigkeit von $0{,}784—10^{-4}$ bei einem Temperaturunterschied von 4,3°.

Eine Temperaturänderung von 0,1° bewirkt also eine Leitfähigkeitsänderung von etwa 0,019 bis $0{,}018.10^{-4}$ oder für die betreffende Apparatur in Kohlensäure umgerechnet: 0,3 bis 0,2 cmm Kohlensäure. Bei einer Temperaturkonstanz von 0,05° C, wie sie in einem Wasserbade durch zwei große Toluolthermoregulatoren (für Gasheizung und Kaltwasserzufluß) leicht zu erhalten ist, ist diese Fehlerquelle also zu vernachlässigen.

Zum Schlusse seien noch einige Leerversuche erwähnt, in denen der nur mit Barytlauge und Sauerstoff gefüllte Apparat viele Stunden lang geschüttelt wurde. Ebenso wie die Autoren, die früher mit Leitfähigkeitsbestimmungen verdünnter Laugen gearbeitet haben (z. B. RAYMOND-WINEGARDEN) konnte auch ich keine absolute Konstanz der Leitfähigkeitswerte erlangen. Der Widerstand der Lösung nimmt ganz allmählich zu; eine Erklärung dafür habe ich nicht finden können.

Dieses Absinken der Leitfähigkeit betrug z. B.

1.) in $7^1/_2$ Stunden . . . $x_{18^{\circ}} = 0{,}035 \cdot 10^{-4}$

2.) in 20 Stunden . . . $x_{18^{\circ}} = 0{,}054 \cdot 10^{-4}$

3.) in 21 Stunden . . . $x_{18^{\circ}} = 0{,}055 \cdot 10^{-4}$

In Kohlensäure umgerechnet würde dies in einer Stunde einen Fehler von 0,1 bis 0,05 cmm Kohlensäure ausmachen, mithin also in die Fehlerbreite der Apparatur fallen, und zu vernachlässigen sein.

Zusammenfassung.

Es wird ein Mikrorespirationsapparat zur gleichzeitigen Messung von Sauerstoff (volumetrisch) und Kohlensäure (durch Leitfähigkeitsbestimmung von $Ba(OH)_2$) beschrieben, dessen Genauigkeit bei einer Temperaturkonstanz von 0,05° C sowohl für O_2 wie für CO_2 etwa 0,5 cmm beträgt.

Es wird eine Leitfähigkeits-Konzentrationskurve von $Ba(OH)_2$ zur Berechnung der CO_2 aus der Leitfähigkeitsänderung und ihre Abhängigkeit von der Temperatur sowie eine Methode zur Eichung der Apparatur mit CO_2 angegeben und die CO_2-Absorptionsgeschwindigkeit in der Apparatur bestimmt.

Über die quantitative mikroanalytische Bestimmung von Jod in organischen Substanzen.

Von **Theodor Leipert.**

(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Universität Wien)

(Eingelangt am 7. Mai 1929.)

Die gravimetrische mikroanalytische Bestimmung von Jod wurde zuerst von PREGL unternommen und in seinem Buche „Die quantitative organische Mikroanalyse" eingehend beschrieben[1]). Er verbrennt die Substanz in einem Verbrennungsrohr im Sauerstoffstrom und leitet den Joddampf über Glasperlen, die mit konzentrierter Sodalösung benetzt sind. Dabei wird das Jod durch das Alkali als Jodid gebunden. Ein Zusatz von Natriumsulfit dient zur Reduktion etwa gebildeten Jodats. In der Spülflüssigkeit dieses „Perlrohres" wird dann das Jodid durch Fällung mit Silbernitrat gravimetrisch bestimmt. Die Methode liefert bei Chlor- und Brombestimmungen ausgezeichnete Werte, stößt jedoch bei der Jodbestimmung auf erhebliche Schwierigkeiten. PREGL selbst schreibt darüber: „Es sei bemerkt, daß Jodbestimmungen zu den schwierigsten Aufgaben der Mikroanalyse gehören, weil die geringsten Verunreinigungen, z. B. Staub, das Gewicht des Jodsilberniederschlages vermehren und damit zu merklich höheren Jodwerten Anlaß geben, entfallen doch mehr als 50% des gewogenen Jodsilberniederschlages auf das zu bestimmende Element Jod."

Noch eine weitere Fehlerquelle verdient Berücksichtigung. Bei der mikroanalytischen Halogenbestimmung wird zur Entfernung des überschüssigen Sulfits etwas Perhydrol zugesetzt und die Lösung damit erhitzt. Während dies nun bei Chlor- und Brombestimmungen einwandfrei durchführbar ist, ergeben sich bei der Jodbestimmung Schwierigkeiten, da die Gefahr besteht, daß beim Erhitzen mit Perhydrol Jodatbildung eintritt. Man nimmt daher bei Jodbestimmungen reichlicher Perhydrol und unterläßt das Erhitzen. Damit ist jedoch keineswegs die Möglichkeit einer geringen Jodatbildung beseitigt, die dann zu höheren Werten führt.

Die maßanalytische Bestimmung kleiner Jodmengen durch di-

---

[1]) FRITZ PREGL: Die quantitative organische Mikroanalyse. J. SPRINGER, Berlin.

rekte Titration des auf irgendeine Weise elementar abgeschiedenen Jods mit entsprechend verdünnter Thiosulfatlösung ist von vornherein wenig aussichtsreich. Infolge des hohen Atomgewichtes des Jods zeigt sich ein Titrationsfehler in der Größe eines Tropfens einer n/100-Thiosulfatlösung bereits als wesentlicher Fehler im Endresultat. Es bleibt so nur die Möglichkeit übrig, das zu bestimmende Jod zu oxydieren und das gebildete Jodat in saurer Lösung mit Kaliumjodid umzusetzen:

$$KJO_3 + 5\,KJ + 3\,H_2SO_4 = 3\,K_2SO_4 + 3\,H_2O + 6\,J.$$

Ein etwa vorhandener Titrationsfehler verringert sich so auf ein Sechstel seines Betrages. Die maßanalytischen Mikrojodbestimmungen, die auf dieser Grundlage bereits unternommen wurden, erstrecken sich in der Mehrzahl der Fälle auf biologisches Material.

J. BUCHHOLZ[2]) bestimmte kleine Jodmengen im Blut nach dem Verfahren von GRÖGER[3]): Die organische Substanz wird durch Permanganat in alkalischer Lösung zerstört, gleichzeitig aber auch das vorhandene Jod zu Jodat oxydiert. Den Überschuß des Permanganats entfernt man durch einige Tröpfchen Alkohol, filtriert vom ausgeschiedenen Braunstein ab und setzt das schwach angesäuerte Filtrat mit Kaliumjodid um. Eine Schwierigkeit der Methode liegt jedoch unleugbar in der Filtration des Braunsteins, der äußerst leicht durch das Filter läuft. BUCHHOLZ empfiehlt daher dichte Filter. Ist das Filtrat jedoch nicht wasserklar und zeigt es auch nur die Spur einer Gelbfärbung, herrührend von kolloidalem Braunstein, dann erhält man wesentlich zu hohe Werte.

FELLENBERG's Methode[4]) besteht im Prinzip im Verbrennen der organischen Substanz (tierischen und pflanzlichen Materials) unter Alkalizusatz. Das Jodid der Asche wird mit Alkohol ausgelaugt, das Jod durch Nitrit-Schwefelsäure in Freiheit gesetzt, mit Chloroform ausgeschüttelt und kolorimetriert. Zur Kontrolle schließt sich nun die maßanalytische Bestimmung an. Sie gründet sich auf die Methode von WINKLER[5]). Das in Chloroform gelöste Jod wird durch Chlorwasser oxydiert, das überschüssige Chlor verkocht und das entstandene Jodat auf bekannte Weise mit Kaliumjodid

[2]) Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 81, 289.

[3]) Zeitschr. f. angew. Chem. 1894, 52—54.

[4]) Biochem. Zeitschr., Bd. 139, 394, 399; Bd. 152, 116.

[5]) Zeitschr. f. analyt. Chem. 39, 81 (1900) (WESZELSKY); Zeitschr. f. angew. Chem. 28, I, 495 (1915).

umgesetzt. Vergleicht man nun die nach diesen beiden Verfahren erhaltenen Werte, so zeigt sich, daß die Titration meist zu hohe Resultate ergibt. Die Unterschiede betragen bei den kleinsten Jodmengen 20 bis 50% oder noch mehr und FELLENBERG selbst empfiehlt, sich in diesen Fällen an die Kolorimetrie zu halten.

Die Zerstörung der organischen Substanz nach den angegebenen Verfahren ist wohl nur bei biologischem Material am Platze. Bei wohlcharakterisierten, jodhaltigen organischen Substanzen, also für Zwecke der organischen Elementaranalyse, ist die Verbrennung im Perlrohr nach PREGL entschieden vorzuziehen. Das Jod der Spülflüssigkeit dagegen bestimmt man am zweckmäßigsten maßanalytisch. Der Versuch, das bei der Verbrennung sich elementar abscheidende Jod durch Ausspülen des Verbrennungsrohres mit Kaliumjodid zu lösen und direkt zu titrieren, scheitert aus den bereits angeführten Gründen und die Oxydation zu Jodat läßt sich auf keinen Fall umgehen. So bestimmte BENEDETTI-PICHLER[6]) bereits mit Erfolg das Jod in der Spülflüssigkeit des Perlrohres nach der Methode von BUCHHOLZ, doch veröffentlichte er seine Untersuchungen nicht. Einfacher scheint uns die Anwendung von WINKLER's, bezw. FELLENBERG's Methodik. Oxydiert man nun das Jod der Spülflüssigkeit, die nach dem Ansäuern zirka 40 ccm beträgt, durch Zusatz von 1 bis 2 ccm frischen Chlorwassers und kocht auf ein Drittel ihres Volumens ein, wie es FELLENBERG verlangt, so findet man regelmäßig zu niedrige Werte: Das Jodat hat sich zersetzt. Der Fehler beträgt 1 bis 2% auf die Einwage bezogen. Kocht man weniger stark ein, dann wird nicht alles Chlor ausgetrieben und die Resultate sind zu hoch. Blindversuche, die mit frischem Chlorwasser angestellt wurden, zeigten übereinstimmend, daß man zur vollständigen Entfernung des Clors mindestens auf ein Drittel des Flüssigkeitsvolumens einkochen muß. Will man eine Konzentration der Flüssigkeit vermeiden und das Chlor durch Wasserdampf austreiben, dann ist langes Durchleiten erforderlich, denn die letzten Reste Chlors werden auch hier hartnäckig zurückgehalten. Prüft man eine so von Chlor befreite Lösung mit Kaliumjodid und Stärke, so tritt augenblicklich wohl keine Blaufärbung auf, doch setzt in auffallend kurzer Zeit ein starkes „Nachbläuen" ein, so daß bei Verwendung von Chlorwasser große Vorsicht geboten ist.

---

[6]) KLEIN-STREBINGER: Fortschritte d. Mikrochemie 1928, 356.

Viel geeigneter zur Oxydation erweist sich Bromwasser. Auch die letzten Spuren Broms verflüchtigen sich leicht schon nach kurzem Kochen der Lösung. Ein Nachbläuen wurde nie beobachtet, selbst wenn die Lösung über Nacht stehenblieb.

Die unerwünschte Eigenschaft des Chlors, sich nur schwer verkochen zu lassen, stellte auch HÖJER[7]) fest, der in einer jüngst erschienenen Arbeit über die Fehlerquellen der FELLENBERG'schen Methodik auch die Verwendbarkeit des Chlorwassers zur Oxydation des Jods einer kritischen Betrachtung unterzog. Auch er gibt dem Bromwasser den Vorzug. Immerhin ist es nicht ratsam, das überschüssige Brom durch Verkochen zu entfernen, da durch die dabei eintretende Konzentrierung der Lösung auch ihre Azidität zunimmt. Damit wächst aber gleichzeitig auch die Gefahr, daß sich Jodat zersetzt und Jod so verlorengeht. Nach HÖJER genügt bereits eine n 10-Säure-Konzentration, um meßbare Mengen Jod aus dem Jodat abzuspalten. An einer Reihe von Versuchen ließ sich zeigen, daß es weit zweckmäßiger ist, den Überschuß des Broms durch Wasserdampf auszutreiben, wodurch man in wenigen Minuten eine bromfreie Lösung erhält.

Für die mikroanalytische Bestimmung des Jods hat sich daher folgende Methode gut bewährt: Die Substanz wird im Perlrohr nach PREGL verbrannt. Das Jodid der schwach angesäuerten Spülflüssigkeit oxydiert man durch Bromwasser, treibt den Überschuß des Broms durch Wasserdampf aus, setzt das gebildete Jodat mit Kaliumjodid um und titriert das frei werdende Jod mit n/100 Thiosulfat.

Ausführung der Bestimmung: 3 bis 5 mg der zu analysierenden Substanz werden im PREGL'schen Perlrohr verbrannt. Die Perlen benetzt man nur mit reiner konzentrierter Sodalösung. Über das freie Ende des Rohres stülpt man zum Schutze einen etwa 300 ccm fassenden Erlenmeyerkolben mit nicht zu engem Hals, der dann die Spülflüssigkeit aufnehmen soll. Im übrigen halte man sich genau an PREGL's Vorschrift. Nach Beendigung der Verbrennung läßt man im Sauerstoffstrom erkalten, entfernt Platinschiffchen und Kontaktstern, bringt einige Tropfen konzentrierter Sodalösung in das Verbrennungsrohr zur Bindung etwa noch vorhandenen freien Jods und spült das Rohr dreimal mit destilliertem Wasser aus. Zur Spülflüssigkeit gibt man einen

[7]) Biochem. Zeitschr., Bd. 205, 273.

Tropfen Methylorange, neutralisiert genau mit 2n Schwefelsäure, die man aus einer Bürette zutropfen läßt, fügt drei weitere Tropfen Schwefelsäure zu bis zur deutlich sauren Reaktion und verdünnt mit Wasser auf 50 bis 60 ccm Flüssigkeit. Nun oxydiert man durch Zusatz von 2 ccm frischem Bromwasser und leitet durch die Lösung einen lebhaften Wasserdampfstrom. Als Einleitrohr dient zweckmäßig ein Glasrohr, das an seinem Ende zu einer siebartig durchlöcherten Kugel erweitert ist. Nach sieben Minuten, vom beginnenden Sieden an gerechnet, senkt man den Kolben, spült das Einleitrohr mit destilliertem Wasser ab und fängt noch die nächsten Tropfen des abtropfenden Kondenswassers auf. Nach dem vollständigen Erkalten fügt man zur Probe 1 g Kaliumjodid, das man sich kurz vor Gebrauch auf einer Handwaage abwägt und in wenig Wasser löst, schwenkt um und läßt n/100 Thiosulfat bis zur schwachen Gelbfärbung zufließen. Erst jetzt setzt man Stärke zu und titriert bis zum vollständigen Verschwinden der Blaufärbung (Vergleich mit destilliertem Wasser!). Ein Sechstel der gefundenen Jodmenge entfällt auf die Substanz. Das n/100 Thiosulfat stellt man sich zu jeder Analysenreihe durch entsprechendes Verdünnen einer n/10-Lösung frisch her. Längeres Aufbewahren einer derartigen Lösung ist unzulässig.

Analysen:

Dijoddiphenyl $C_{12}H_8J_2$ Ber. 62,54% J

mg Subst.	ccm n/100 Thiosulfat	% J gef.
4,356	12,86	62,45
4.818	14,22	62,43

β-Jodnaphthalin $C_{10}H_7J$ Ber. 49,98% J

mg Subst.	ccm n/100 Thiosulfat	% J gef.
3,806	8,98	49,91
4,799	11,30	49,81

Jodmethylamidooxazolin $C_4H_9ON_2J$ Ber. 55,67% J

mg Subst.	ccm n/100 Thiosulfat	% J gef.
5,313	14,00	55,74
4,654	12,28	55,81

Tetrajodpyrrol C_4HNJ_4 Ber. 88,96% J

mg Subst.	ccm n/100 Thiosulfat	% J gef.
4,419	18,55	88,80
3,942	16,54	88,75

Jodoform CHJ_3 Ber. 96,69% J

mg Subst.	ccm n/100 Thiosulfat	% J gef.
4,014	18,30	96,44
3,822	17,42	96,41

Trithioformaldehyddijodid $C_3H_6S_3J_2$ Ber. 64,75% J

mg Subst.	ccm n/100 Thiosulfat	% J gef.
4,491	13,74	64,72

Die Werte sind in der Regel um 0,1 bis 0,2% niedriger, als der Theorie entspricht. Die Methode ist leicht zu handhaben und stellt an die Geschicklichkeit des Analytikers keine Anforderungen, so daß sie auch der Anfänger ohne Schwierigkeit bewältigt.

Beiträge zur Mikrojodbestimmung.

Von **Gulbrand Lunde, Karl Closs** und **Jens Böe.**

(Aus dem Pharmakolog. Institut der Universität Oslo, Norwegen.)

(Eingelangt am 2. Juli 1929.)

I. Über die Veraschung der Substanz und die Anreicherung des Jods, besonders bei dem v. Fellenberg'schen Jodbestimmungsverfahren.

(Von **Gulbrand Lunde** und **Karl Closs.**)

Einleitung. Bei der quantitativen Bestimmung geringer Jodmengen, wie sie in tierischen, pflanzlichen und mineralischen Stoffen vorkommen, kommt es darauf an, das gesamte in der zu untersuchenden Substanz vorhandene Jod in eine Form überzuführen, in der es sich einheitlich und quantitativ mit den für die Bestimmung dienenden Reagenzien umsetzt. Als solche Form kommt praktisch nur das anorganisch gebundene Jod in Frage.

Ein Teil des Jods ist nun gewöhnlich so fest an die organische Substanz gebunden, daß es nicht gelingt, diesen Teil selbst durch ziemlich kräftig wirkende Mittel quantitativ in anorganisch gebundenes Jod überzuführen. Es ist deshalb notwendig, die organische Substanz vollständig zu zerstören, auch deshalb, weil ihre Gegenwart die Nachweisreaktionen stört. Es ist selbstverständlich, daß diese Zerstörung unter Bedingungen vorgenommen werden muß, unter denen keine Jodverluste eintreten. Dies wird erreicht durch Anwendung eines der folgenden Verfahren:

1. Verbrennung der Substanz, eventuell unter Zusatz von wenig Kalk im Sauerstoffstrom, und Auffangen der Verbrennungsprodukte in einer alkalischen Flüssigkeit (McClendon[1]), v. Fellenberg[2]), Schwaibold[3]), Reith[4])). Das Verfahren ist theoretisch einwandfrei, hat aber den Nachteil, daß es zeitraubend ist; außerdem kommt es für Massenanalysen frischen Materials überhaupt nicht in Frage.

2. Die Substanz wird an der Luft bei mäßig hoher Temperatur bei Gegenwart eines Alkaliüberschusses verbrannt, ohne Zusatz

[1]) J. F. McClendon, Journ. biol. Chemistry *60*, 289 (1924); Physiol. Rev. *7*, 189 (1927); Journ. Amer. chem. Soc. *50*, 1093, 1928; *51*, 394, 1929.

[2]) Th. v. Fellenberg, Mikrochemie *7*, N. F. 1. 242, 1929, vergl. besonders Seite 262—263.

[3]) J. Schwaibold, Chem.-Ztg., *53*, 22 (1929).

[4]) J. F. Reith, Rec. Trav. chim. Pays Bas, *48*, 254 (1929).

eines Oxydationsmittels nach CHATIN[5]), KENDALL[5a]) und v. FELLENBERG[6]) oder auch mit einem Oxydationsmittel. Hierbei wird alles Jod in Jodid übergeführt. Die Hauptschwierigkeit dieses Verfahrens besteht in der Regulierung der Temperatur. Bei zu hoher Temperatur treten Jodverluste ein, während bei zu niedriger Temperatur die Substanz nicht ganz zerstört wird.

3. Man verwendet feuchte Verbrennung in schwefelsaurer Lösung und fängt das entweichende Jod in einer alkalischen Flüssigkeit auf (GAUTIER[7]), WILKE-DÖRFURT[8]), PFEIFFER[9])).

In den allermeisten Fällen ist die Konzentration des Jods in dem angewendeten Material so gering, daß keine Reaktion empfindlich genug ist, einen Nachweis in dieser Verdünnung zu gestatten. Das Jod muß daher erst angereichert werden, bevor die eigentliche Bestimmung vorgenommen werden kann. Es ist aber auch notwendig, es von allen Begleitstoffen möglichst weitgehend zu befreien, damit eine einwandfreie Bestimmung gewährleistet ist.

Die Veraschung der organischen Substanz bei freiem Luftzutritt, wie sie v. FELLENBERG (l. c.) bisher fast ausschließlich verwendet hat, ist für Serienanalysen, besonders von frischem organischen Material, zweifellos am geeignetsten.

Dieses Verfahren ist wohl deshalb auch das am häufigsten verwendete. Die Handhabung ist aber nach der v. FELLENBERG'schen Originalvorschrift selbst für den Geübteren recht schwierig, was v. FELLENBERG selbst stets zugegeben hat[10]).

Die Hauptschwierigkeit liegt darin, daß der Analytiker die Fehler, die er bei der Ausführung der Bestimmung macht, erst am Schlußresultat der Analyse erkennt. Bei der Bestimmung unbekannter Jodmengen muß man sich vor allem davor hüten, in der Übereinstimmung zweier Parallelanalysen einen Beweis für die Richtigkeit dieser Bestimmung zu sehen. Analysen unter Zusatz von bekannten Mengen Kaliumjodid, wie sie von verschiedenen Forschern als Kontrollmittel angewendet werden, bieten, wie der eine von uns (K. CLOSS) wiederholt gefunden hat, ebensowenig

---

[5]) A. CHATIN, Compt. rend. Acad. Sciences, *30*, 352 (1850); *82*, 128 (1876).

[5a]) E. C. KENDALL, Journ. biol. Chem., *40*, 265 (1919); *43*, 149 (1920).

[6]) v. FELLENBERG, Ergebn. der Physiol., *25*, 176—363 (1926).

[7]) A. GAUTIER, Compt. rend. Acad. Sciences, *128*, 643, 1069 (1899).

[8]) E. WILKE-DÖRFURT, Ztschr. angew. Chem., *40*, 1478 (1927).

[9]) G. PFEIFFER, Biochem. Ztschr., *195*, 128 (1928).

[10]) TH. v. FELLENBERG, Mikrochemie, *7 (N. F. 1)*, 262 (1929).

eine Gewähr für die Richtigkeit der Ausführung. Nur durch Wiederholung der Verbrennung unter ständiger Abänderung der Bedingungen kann man über die gemachten Fehler klar werden und die Bedingungen ausfindig machen, unter denen die Analyse in allen Fällen zuverlässige Resultate liefert. Diese Bedingungen sind je nach der Art des untersuchten Materials verschieden. Wir wollen hier die von uns im Laufe der letzten Jahre bei der Untersuchung des verschiedenartigsten tierischen und pflanzlichen Materials gesammelten Erfahrungen wiedergeben.

Wir waren hauptsächlich danach bestrebt, die Methode möglichst weitgehend zu schematisieren, damit sie auch von weniger geübten Jodanalytikern mit Erfolg verwendet werden kann.

Der Gang der Analyse gestaltet sich wie bei v. FELLENBERG, und die folgenden Ausführungen sollen nur eine Ergänzung und Schematisierung der v. FELLENBERG'schen Originalvorschrift darstellen.

Der Gang der Analyse.

1. Die Zerstörung der organischen Substanz.

a) Das Auflösen des Materials. Um eine gute Durchschnittsprobe des zu untersuchenden organischen Materials zu erhalten, wird eine etwas größere Menge folgendermaßen in Lösung gebracht: Die gewogene Probe versetzt man mit einem Stückchen Ätzkali und wenig Wasser und erwärmt solange auf dem Wasserbade, bis vollständige Lösung eingetreten ist. Die zugesetzte Menge Ätzkali soll etwa 25 bis 50% vom Gewicht der Probe betragen. Die Zugabe von wenig Alkohol beschleunigt die Auflösung. Bei fettreichem Material muß man mehr Alkohol anwenden und häufig umschütteln. Fette und Öle werden mit alkoholischem Kali verseift.

Eiweißreiche Substanzen bilden bei der nachfolgenden Verbrennung reichlich Kohle, außerdem Blausäure und Ammoniak. Alle diese Stoffe stören die Bestimmung des Jods[11]).

[11]) Vergl. TH. v. FELLENBERG (l. c.) über den störenden Einfluß des Ammoniaks; G. LUNDE und TH. v. FELLENBERG, Ztschr. anorg. allg. Chem., *165*, 234 (1927), über die Adsorption des Jods an Kohle und Kieselsäure. M. GUERBERT, Journ. Chim. Phys., *17*, Nr. 7 (1903), sowie J. CURTMAN und C. KAUFMAN, Journ. Amer. chem. Soc., *40*, 914 (1918), weisen auf den störenden Einfluß der Cyanide hin.

Es ist daher ratsam, beim Auflösen mehr Kalilauge als gewöhnlich zu verwenden (bis zum Vierfachen vom Gewicht der Probe). Der Zusatz von mehr Kalilauge hat folgende Vorteile:

1. Er bewirkt, daß die Masse beim Erhitzen zum Schmelzen kommt.

2. Er verhindert oder vermindert die Abscheidung von Kohle, indem die Kalilauge mit der Kohle unter Bildung von Karbonat reagiert.

3. Er bewirkt die Zersetzung von Cyaniden und Ammoniumsalzen.

Zellulose, Chitin und ähnliche Verbindungen werden erst beim Schmelzen mit Ätzalkalien zersetzt. Will man in ihnen Jod nachweisen, so muß die alkalische Lösung zur Trockne verdampft werden und dann über freier Flamme unter stetigem Umschwenken zum Schmelzen erhitzt werden. Unter starker Gasentwicklung wird die Substanz zersetzt und läßt sich dann in Wasser auflösen. In derselben Weise verfährt man mit kieselsäurereichem Material.

Ist die Probe dagegen kalkreich, so muß sie entweder erst mit Lauge und dann mit Salzsäure, oder besser, erst mit Salzsäure (am Rückfluß) und dann mit Kalilauge behandelt werden. Genauere Vorschriften für die Bestimmung des Jods in solchen kalkreichen Proben werden weiter unten gegeben.

b) Das Veraschen. Ein aliquoter Teil des gelösten Materials (entsprechend zirka 1 g frischer Substanz) wird in eine Eisenschale (besser eine V2A-Schale von Krupp) gebracht, mit 1 bis 2 ccm etwa 50%iger Pottaschelösung versetzt und auf dem Wasserbade soweit als möglich eingedampft. Fast immer enthält der Eindampfrückstand noch etwas Wasser; man muß daher sehr vorsichtig sein, wenn man nun mit dem Erhitzen über freier Flamme beginnt. Man vermeidet lästiges Spritzen dadurch, daß man im ersten Augenblick mit sehr starker Flamme erhitzt, damit das Wasser aus den unteren Schichten ausgetrieben wird, ehe die ganze Salzmasse zusammengebacken ist. Sobald die Masse anfängt, harte Krusten zu bilden, stellt man den Brenner rasch ganz klein und steigert dann erst ganz allmählich die Temperatur wieder bis auf etwa 450 bis 500°. Das Spritzen ist besonders lästig bei Proben, die viel Chloride oder Sulfate enthalten; bei der Untersuchung von sauren Aufschlüssen ist daher besondere Vorsicht geboten.

Schließlich erhitzt man die Substanz etwa zehn Minuten lang bei 450 bis 500° und prüft dann, ob der bei der Verbrennung auftretende Geruch verschwunden ist. Gegebenenfalls setzt man das Erhitzen solange fort, bis der Geruch auf alle Fälle nur noch ganz schwach ist. Es ist gut, die Schale etwas schief zu stellen, damit sich ein Luftstrom ausbilden kann, der die Verbrennungsgase mitreißt. Man muß darauf achten, daß an keiner Stelle Überhitzung eintritt.

Ist der Verbrennungsgeruch fast oder ganz verschwunden, so schreckt man die Schale in kaltem Wasser ab und löst den Inhalt in wenig Wasser. Haben sich Kohleklumpen gebildet, so müssen diese mit einem Pistill verrieben werden. Sind die Salzkrusten während der Verbrennung sehr hart geworden, so muß man nochmals 1 bis 2 ccm Pottaschelösung zusetzen, ehe weiter verbrannt wird. Dann dampft man wieder ein. Um Zeit zu sparen, kann man dieses Eindampfen über freier Flamme vornehmen (oder auf dem Sandbad). Sobald das Eintrocknen beginnt, muß man durch Einhaltung der oben beschriebenen Vorsichtsmaßregeln mögliches Spritzen verhindern. Man erhitzt dann wieder auf 450 bis 500° und fährt solange mit dem Erhitzen fort, bis der Geruch verschwunden ist. Dann wird die Schale wieder abgeschreckt, der Inhalt in wenig Wasser aufgelöst, die Kohleklumpen zerrieben, wieder zur Trockne verdampft und wieder bis zum Verschwinden des Geruchs erhitzt.

Wenn nach dreimaliger Verbrennung die gebildete Kohle immer noch nicht verbrannt ist, setzt man reichlich Wasser zu (etwa 50 ccm), läßt kurze Zeit stehen, saugt dann von der Kohle durch ein kleines Filterchen ab, wäscht zweimal mit etwa 10 ccm Wasser nach und saugt dann noch einige Zeit kräftig, um die Hauptmenge der Flüssigkeit aus der Kohle herauszusaugen. Dann bringt man die Kohle mitsamt dem Filterchen in die Eisenschale zurück, spült alle im Trichter haftenden Reste nach, verdampft zur Trockne und verbrennt alles bei schwacher Rotglut. Nun gießt man das Filtrat in die erkaltete Schale zurück, dampft wieder zur Trockne ein und erhitzt bis zum Verschwinden des Geruchs, wie oben beschrieben. Manchmal muß das Erhitzen noch ein zweites Mal vorgenommen werden.

Die Seifen von tierischen Fetten und Ölen verbrennen im allgemeinen sehr schwer. Das Filtrat von der Kohle ist in solchen Fällen häufig dunkelbraun bis schwarz. Bei der nachherigen Ver-

brennung tritt wieder Kohlebildung auf. Die Kohle wird wieder abfiltriert und für sich verbrannt. Es ist ratsam, bei fetten Substanzen:

1. mit der Temperatur so hoch zu gehen, wie überhaupt zulässig, ohne Jodverluste befürchten zu müssen,

2. zum Entfernen der Kohle entweder ein Oxydationsmittel ($NaNO_3$) oder etwas Ätzkali zuzusetzen.

Die Verbrennung der organischen Substanz kann nur dann als vollständig angesehen werden, wenn die Salzmassen nach dem Veraschen reinweiß oder durch Beimischung von Ferrioxyd hellrotbraun gefärbt sind. Alle grauen Töne deuten auf unvollständige Verbrennung.

2. Die Anreicherung des Jods und die Zerstörung der letzten Spuren organischer Substanz.

a) Die Alkoholextraktion. Nachdem sich die Schale abgekühlt hat, gibt man etwa 2 bis 3 ccm 96%igen Alkohol auf die Salzmasse, setzt einige Tropfen Wasser zu und läßt dann mindestens zehn Minuten stehen. (Die Schale soll mit einem Uhrglas bedeckt werden.) Dabei wird die Salzmasse aufgeweicht. Dann verreibt man solange mit einem Achatpistill, bis sich ein gleichmäßiger, dickflüssiger Salzbrei gebildet hat und an keiner Stelle mehr Salzkrusten an der Schale haften. Sollte letzteres der Fall sein, so werden die Krusten durch vorsichtiges Zutropfen von Wasser (oder auch Pottaschelösung) und erneutes Verreiben aufgelöst.

Jetzt wird der Alkohol durch Dekantieren in eine etwa 5 cm weite Goldschale mit flachem Boden übergeführt[12]). Zu diesem Zweck wird der Rand der Eisenschale außen mit etwas Vaseline bestrichen und der Rand der Goldschale an einer Stelle nach innen gebogen (nicht geknickt!). Bringt man nun die eingebogene Stelle der Goldschale zur Berührung mit dem inneren Rand der Eisenschale, so gelingt es durch Neigen der Schalen gegeneinander, den Alkohol ohne Verluste in die Goldschale überzugießen. Die Extraktion wird mindestens dreimal wiederholt.

b) Die erste Verbrennung in der Goldschale.

[12]) Goldschalen werden von uns an Stelle von Platinschalen verwendet. Sie haben den Vorzug der relativen Billigkeit, müssen aber sehr vorsichtig behandelt werden.

Man setzt zu der alkoholischen Lösung in der Goldschale etwa fünf Tropfen 50%ige Pottaschelösung und soviel Wasser, daß sich eine homogene Lösung bildet, und dampft auf dem Wasserbade zur Trockne ein. Der Wasserzusatz bewirkt, daß das Eindampfen auf dem Wasserbade langsamer und ruhiger verläuft und daß die gelösten Salze sich ausschließlich auf dem Boden der Schale absetzen.

Nach beendigtem Eindampfen erhitzt man die Schale vorsichtig über einer kräftigen, nichtleuchtenden Bunsenflamme. Man muß dafür Sorge tragen, daß alle Teile der Schale gleichmäßig, aber nicht zu stark ausgeglüht werden; dies wird durch stetes Hin- und Herbewegen erreicht, so daß die Schale jeweils nur kurz in die Flamme kommt. Während des Erhitzens löst sich meistens ein Teil der Salze vom Boden ab und kann so nicht ordentlich ausgeglüht werden. Man kühlt daher die Schale ab, löst den Inhalt in ein paar Tropfen Wasser, verdampft zur Trockne und glüht wieder vorsichtig. Es muß solange mit dem abwechselnden Glühen und Auflösen fortgefahren werden, bis die Salze beim Eindampfen den Boden der Schale mit einem gleichmäßigen Überzug bedecken und reinweiß geworden sind.

c) Die Alkoholextraktion in der Goldschale. Man läßt erkalten, fügt etwa 2 ccm 96%igen Alkohol und ein bis zwei Tropfen Wasser zu, verreibt mit dem Pistill, bis sich ein gleichmäßiger Salzbrei gebildet hat, führt den alkoholischen Auszug durch Dekantieren in eine andere Goldschale, oder besser, in eine Gold-Platinschale (90% Au, 10% Pt) über und dampft ohne Zusatz von Pottasche auf dem Wasserbad zur Trockne. Es wird auch hier Wasser zugesetzt, um das Verdampfen des Alkohols ruhiger zu gestalten. Die zurückbleibenden Salze sollen nur einen dünneren Beschlag auf dem Boden der Schale bilden.

Größere Mengen von Salzen werden hier stets bei der Extraktion chloridreicher Salzgemische beobachtet, wie auch bei solchen, die freie Kalilauge enthalten (diese wird am besten durch Überleiten von Kohlensäure in Karbonat verwandelt). In solchen Fällen müssen noch einmal ein paar Tropfen Pottaschelösung zugesetzt und die Extraktion nach dem Eindampfen und Glühen wiederholt werden.

d) Die zweite Veraschung in der Platin-Goldschale. Man erhitzt nun die Schale in einer starken, nichtleuchtenden Bunsenflamme. Bei diesem letzten „Glühen“ treten am

leichtesten Verluste ein. Man muß darauf achten, daß die Schale stets nur ganz kurze Zeit in die Flamme kommt. Die Salze dürfen keinesfalls zum Schmelzen kommen.

Es kommt manchmal vor, daß beträchtliche Mengen organischer Substanz sich allen vorhergehenden Verbrennungen entziehen und erst bei der letzten Veraschung unter Bildung von Kohle und brauner Zersetzungsprodukte zerstört werden. War dies der Fall, so wiederholt man das Glühen mit Pottasche, extrahiert wieder und glüht dann noch ein letztes Mal.

3. Der Analysengang bei Gegenwart großer Mengen von Kalksalzen.

Bei der Untersuchung von sehr kalkreichen Substanzen haben wir die Erfahrung gemacht, daß das v. FELLENBERG'sche Verfahren auch in der jetzt von uns geschilderten Form in manchen Fällen nicht zum Ziele führt. Wir beobachteten gelegentlich Fehlresultate, wo nur ein Fünftel bis ein Sechstel des Gesamtjods bei Einhaltung des üblichen Analysenganges zur Bestimmung gelangt.

Es zeigte sich, daß in diesen Fällen das Jod nach der Veraschung in alkoholunlöslicher Form vorlag und sich dadurch der Bestimmung entzog. In solchen Fällen kommt man zum Ziel, wenn man den Glührückstand in Salzsäure löst und nachher die Flüssigkeit wieder alkalisch macht, ehe man mit Alkohol extrahiert.

Bequemer und sicherer kommt man zum Ziel, wenn man nach der gewöhnlichen Verbrennung in der Eisenschale Wasser zusetzt, auf dem Wasserbad erwärmt und das ungelöste, zurückbleibende Kalziumkarbonat heiß filtriert und mit heißem Wasser gründlich auswäscht. Man kann dann noch den Kalk mit Säure vom Filter lösen, wieder ausfällen und abfiltrieren.

Da aber bei gründlichem Auswaschen mit heißem Wasser nur ein unbeträchtlicher Teil des Jods auf dem Filter zurückgehalten wird, kann man sich damit begnügen, den Filterrückstand nochmals unter Zusatz von etwas Pottasche zu verbrennen. Das Filtrat wird zur Trockne verdampft, nochmals geglüht, mit Alkohol extrahiert und die alkoholischen Auszüge alle vereinigt.

Das oben erwähnte Verhalten sowie der Umstand, daß bei anderen untersuchten kalkreichen Proben das gewöhnliche v. FELLENBERG'sche Verfahren Werte lieferte, die nur etwa 15% zu niedrig waren, legt die Vermutung nahe, daß das Jod in manchen

Fällen anders gebunden ist. Es ist wahrscheinlich, daß es als schwerlösliches Kalziumjodat vorliegt, welches entweder von vornherein vorhanden war oder sich während der Verbrennung unter der Einwirkung von Oxydationsmitteln gebildet hatte. Diese Annahme wird durch die Beobachtung von KARL CLOSS[13]) gestützt, daß diejenigen Proben, bei denen sich am meisten Jod der Bestimmung entzog, vor der Verbrennung beim Ansäuern aus Kaliumjodid beträchtliche Mengen Jod frei machten, während die Proben, die auch nach dem alten Verfahren untersucht, annähernd gleich hohe Werte gaben, nur schwache oder keine oxydierenden Eigenschaften besaßen.

Da die Trinkwässer der Kropfgegenden, die sehr häufig der Gegenstand von Joduntersuchungen waren, meistens sehr hart (kalkreich) sind, so dürften diese Beobachtungen nicht ohne praktisches Interesse sein. v. FELLENBERG beschreibt die Jodbestimmung in Wässern wie folgt[14]):

„Man bringt das Wasser in einen geräumigen Kolben aus Jenaer Glas, versetzt mit etwas Phenolphtalein und soviel Pottaschelösung, daß eine stark rote Farbe auftritt, und dampft auf ein kleines Volumen ein. Wenn sich bei Trinkwasser oder Flußwasser Kalk abscheidet, so filtriert man nach einiger Zeit." Das Filtrat wird weiter untersucht, der Filterrückstand dagegen vernachlässigt.

Es wurde diese Methode bereits von CHATIN[15]) verwendet, der auch angibt, daß die harten, viel Kalk und Magnesia enthaltenden Wässer ihr Jod schnell verlieren.

Es ist schwer verständlich, warum kalkreiche Lösungen besonders leicht ihr Jod verlieren sollen, da sie doch alkalisch sind. Ist es nicht nach unseren oben mitgeteilten Ergebnissen eher anzunehmen, daß das Jod den Analytikern in solchen Fällen bei der Analyse entgangen ist?

Nach verschiedenen Forschern soll auch ein Teil des Jods im Meerwasser als Kalziumjodat vorliegen (SONSTADT[16]).

Auch für die Jodmangeltheorie des Kropfes dürften diese Beobachtungen von Wichtigkeit sein. Der Jodmangel einer Gegend wird nämlich von den meisten Forschern durch Wasseranalysen festgestellt.

[13]) KARL CLOSS, Diss. München 1929. Wird demnächst veröffentlicht.
[14]) TH. v. FELLENBERG, Ergebn. der Physiol. *25*, 196 (1927).
[15]) A. CHATIN, cit. nach v. FELLENBERG l. c. Seite 183.
[16]) E. SONSTADT, Chem. News, *25*, 196, 231, 241 (1872).

II. Über die Titration sehr kleiner Jodmengen.

Nachdem das Jod der organischen Substanz angereichert und von den organischen Begleitstoffen befreit ist, erfolgt die eigentliche Bestimmung entweder kolorimetrisch nach v. FELLENBERG oder titrimetrisch. Beträgt die vorhandene Jodmenge mehr als 1 γ (= 0,001 mg), so kann sie in allen Fällen titriert werden.

Die Titration
(nach Winkler von G. Lunde und J. Böe.)

L. W. WINKLER[17]) führt das Jodid durch Oxydation mit Chlorwasser in Jodat über, bringt das Jodat in saurer Lösung mit Kaliumjodid zur Reaktion und titriert das ausgeschiedene Jod mit Natriumthiosulfat:

$$HJO_3 + 5HJ \rightleftharpoons 3J_2 + 3H_2O.$$

Diese Methode ist besonders in den letzten Jahren von verschiedenen Forschern ausgebaut worden. STURM[18]) titriert Jodmengen bis zu 1 γ herab, wobei er eine „Verzögerung" des Indikatorumschlages berücksichtigen muß. HÖJER[19]) hat kürzlich die Titration, wie sie von v. FELLENBERG und anderen und auch von uns verwendet wird, kritisiert. Es ist uns aber nicht gelungen, in seiner langen Arbeit eine einzige wirkliche Verbesserung zu finden.

Wir verfahren bei der Bestimmung folgendermaßen:

Der schwach geglühte, geringe Salzrückstand in der Platin-Goldschale wird in wenig Wasser gelöst und quantitativ in einen sorgfältig ausgedämpften, 50 ccm fassenden Jenaer Erlenmeyerkolben übergespült. Zuerst werden zwei Tropfen etwa 15 %ige jodfreie Salzsäure zugesetzt, dann etwa 0,5 ccm frisch hergestelltes Chlorwasser. Das Chlorwasser wird aus Braunstein, Kochsalz und Schwefelsäure hergestellt, und hält sich, wenn im Dunkeln und unter Luftabschluß aufbewahrt, einige Tage. Man darf zur Darstellung des Chlorwassers nicht Chlorkalk nehmen, da das Chlorwasser nach dieser Methode dargestellt, geringe Mengen Chlorsäure enthält. Die Oxydation des Jodids zu Jodat ist in wenigen Sekunden beendet. Das Chlor muß im Überschuß vorhanden sein, man überzeugt sich davon durch die momentane Ent-

[17]) L. W. WINKLER, Zeitschr. angew. Chem. *28*, 477, 494 (1915); *29*, 207, *342* (1906); Pharmaz. Zentralhalle, *63*, 386 (1922); *64*, 511 (1923).

[18]) A. STURM, Biochem. Zeitschr. *200*, 273 (1928).

[19]) J. A. HÖJER, Biochem. Zeitschr. *205*, 273 (1929).

färbung eines zugesetzten Tropfens Methylorange. Das zugesetzte Methylorange stört die Titration nicht. Das überschüssige Chlor wird nun durch Kochen aus der Lösung entfernt. Um ein Stoßen der Flüssigkeit zu vermeiden, wird wenig pulverisierter, nach einem besonderen Verfahren (vergl. v. FELLENBERG) präparierter Bimsstein zugesetzt. Versuche von BÖE haben gezeigt, daß es beim Vertreiben der letzten Spuren von Chlor nicht auf den Grad der Konzentrierung der Flüssigkeit ankommt, sondern auf die Dauer des Kochens. Zwei Minuten langes Kochen genügt zur vollständigen Entfernung des Chlors, selbst wenn ein relativ großer Überschuß an Chlorwasser verwendet wurde. Man muß sich davor hüten, zu weit einzukochen, weil sonst Jodverluste infolge Verflüchtigung als Jodchlorid eintreten.

$$2HJO_3 + 10HCl \rightleftharpoons 2JCl + 4Cl_2 + 6H_2O$$

Der Kolben wird rasch abgekühlt und ein Körnchen Kaliumjodid zugesetzt. Das ausgeschiedene Jod wird mit 1/250 Natriumthiosulfatlösung titriert. Zwei Tropfen Stärkelösung werden gegen Ende der Titration zugesetzt. Nach diesem Verfahren haben wir stets Jodmengen bis zu 1 γ herab titrieren können. Der Titer ist bei so geringen Jodmengen etwas anders und muß mit einer bekannten Menge ähnlicher Größenordnung bestimmt werden, da die Übertitration hier berücksichtigt werden muß. Nach REITH[20]) wird die Titration durch die Gegenwart von Bromiden gestört. Wir haben diese Beobachtungen nicht gemacht. Ferner wird die Titration durch Anwesenheit von Nitrit beeinträchtigt, worauf REITH ebenfalls hinweist. REITH zerstört die Nitrite vor der Titration mit Natriumazid. Im übrigen sei auf v. FELLENBERG's[21]) kürzlich erschienenes Sammelreferat über Mikrojodbestimmung hingewiesen.

Die Titration nach Schulek und Stasiak

(von **Karl Closs.**)

E. SCHULEK und A. STASIAK[22]) haben ein Verfahren zur Bestimmung des Jods in Schilddrüsenpräparaten ausgearbeitet. Sie verwenden für die Analyse 0,1 g Schilddrüsenpulver, dessen Gesamtjod zur Bestimmung gelangt. Die zu titrierende Jodmenge ist

[20]) J. F. REITH, Rec. Trav. chim. Pays-Bas, *48*, 386 (1929).

[21]) v. FELLENBERG, diese Ztschr. *N. F. 1*, 242—263 (1929).

[22]) E. SCHULEK und A. STASIAK, Pharmaz. Zentralhalle, *69*. 113, 513 (1928).

deshalb verhältnismäßig groß, und wir können die Methode in der ursprünglichen Form deshalb als eine Halb-Mikromethode bezeichnen. Sie verfahren bei der Bestimmung wie folgt:

0,1 g Schilddrüsenpulver wird in einem Nickeltiegel mit 2,5 g Kaliumhydroxyd zusammengeschmolzen und bis zur Zerstörung der organischen Substanz erhitzt. Die aufgelöste Schmelze wird mit 20%iger Schwefelsäure neutralisiert (Methylorange als Indikator) und 4 ccm Bromwasser und nachher 5 ccm 5%ige Phenollösung, oder besser 0,5 ccm frisch bereitete Natriumhypobromitlösung (dargestellt aus einem Teil 5%iger Natronlauge und einem Teil gesättigtem Bromwasser) und nach dem Schütteln 0,5 ccm einer 5%igen Phenollösung zugegeben. Nach mehrmaligem Schütteln gibt man zur Lösung 0,1 g Kaliumjodid, 5 ccm 20%ige Phosphorsäure und nach fünf Minuten wird das ausgeschiedene Jod mit Natriumthiosulfat titriert.

Es wurden nun Versuche darüber angestellt, ob sich diese Methode auch bei der Bestimmung des Jods in anderen und auch jodärmeren Substanzen unter Zugrundelegung des v. FELLENBERGschen Verbrennungsverfahrens[23]) anwenden läßt.

Insbesondere war es von Interesse zu untersuchen, ob sich auch kleinere Jodmengen, als die von SCHULEK und STASIAK bestimmten, bei entsprechender Abänderung des Verfahrens mit befriedigender Genauigkeit titrieren lassen. Dies läßt sich tatsächlich erreichen, wenn man die folgenden Punkte berücksichtigt:

1. Die Lösung muß vor dem Versetzen mit Brom möglichst genau neutral sein. Dies erreicht man am besten dadurch, daß man erst mit 20%iger Schwefelsäure eben sauer macht und dann vorsichtig 5%ige Kalilauge zugibt, bis die Farbe des als Indikator verwendeten Methylorange nach gelb umschlägt. Ein Überschuß an Alkali ist unbedingt zu vermeiden, da in einem solchen Falle die Titrationswerte zu hoch ausfallen, weil das Nachbläuen der Stärke viel schneller erfolgt als bei der gewöhnlichen Titration.

2. Man darf keinen großen Bromüberschuß anwenden. Für Werte bis zu 200 γ Jod genügen zwei Tropfen gesättigtes Bromwasser. Es ist ratsam, das Bromwasser tropfenweise zuzugeben, bis die

[23]) v. FELLENBERG, „Das Vorkommen, der Kreislauf und der Stoffwechsel des Jods", Ergebnisse der Physiologie, *25*, 176—363 (1926). G. LUNDE, K. CLOSS und K. WÜLFERT, „Untersuchungen über den Jodstoffwechsel I und II", Biochem. Ztschr., *193*, 94 (1927); *206*, 248 (1929).

Lösung deutlich gelb ist. Auf diese Weise bekommt man gleichzeitig einen ungefähren Begriff von der Menge des vorhandenen Jods. Von 50 γ Jod an aufwärts wird auf Zusatz eines Tropfens Bromwasser erst Jod ausgeschieden. Es darf nicht soviel Brom in der Lösung vorhanden sein, daß bei Zusatz von Phenol eine Ausfällung eintritt.

3. Der Überschuß an Phenol muß reichlich sein. Bei Verwendung von nicht mehr als fünf Tropfen gesättigtem Bromwasser genügen 0,5 ccm 5%ige Phenollösung zur Entfernung des Bromüberschusses.

Nach Zusatz des Phenols soll die Lösung farblos und wasserklar sein. Eine gegebenenfalls auftretende schwache Trübung oder Ausflockung wird durch Zusatz von etwas Wasser wieder gelöst.

Nach dem Zusatz des Phenols schüttelt man mehrmals kräftig und läßt etwa zwei Minuten stehen. Man kann das Ansäuern vor der Titration genau so gut mit zwei Tropfen 20%iger Schwefelsäure, statt mit den von SCHULEK und STASIAK verwendeten 5 ccm 20%iger Phosphorsäure vornehmen. Die 5 ccm Phosphorsäure würden das Flüssigkeitvolumen, das sowieso im allgemeinen schon etwa 10 ccm beträgt, unnötig vergrößern und dadurch die Bestimmung des Endpunktes bei der Titration erschweren.

Die Methode hat den Vorteil, daß sie nur einmaliges Verbrennen in der Goldschale unter Pottaschezusatz fordert, da bei der Titration Spuren von organischer Substanz und auch Salze fast keinen störenden Einfluß haben. Letztere bewirken lediglich das Auftreten von rötlichen Übergangstönen bei der Titration. Man kann mit der Methode auch Werte unterhalb 50 γ Jod sehr gut bestimmen, wenn man den Titer der Thiosulfatlösung für die entsprechenden Werte ermittelt. Die Werte stimmen sehr gut untereinander überein, und eine Kontrolle mit der WINKLER'schen Methode zeigte nirgends Abweichungen über 10%. Durch die hohe Salzkonzentration tritt die von A. STURM beschriebene „Verzögerung" des Umschlages hier schon bei höheren Werten ein. Für kleine Werte empfiehlt es sich daher, die Verbrennung ganz in gewohnter Weise auszuführen.

Bei der Bestimmung des Thiosulfattiters (was täglich geschehen muß) ist es notwendig, die Lösung erst anzusäuern und dann, wie oben angegeben, wieder zu neutralisieren, weil sonst die Werte nicht vergleichbar sind. Man verwendet bei der Titration vorteilhafterweise eine englumige Bürette, die 10 ccm faßt und die es gestattet, auf Kubikmillimeter genau abzulesen. Bei beiden Titra-

tionsverfahren benutzt man eine Natriumthiosulfatlösung, die 1 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ im Liter enthält.

Die Methode von SCHULEK und STASIAK ist ungeeignet zur Kontrolle kolorimetrischer Resultate. Es ist nämlich weder in alkalischer, noch in neutraler, noch in saurer Lösung möglich, Nitrit mit Brom zu Nitrat zu oxydieren. Da aber Nitrit die Titration stört, muß es entweder durch Erhitzen mit Traubenzucker (SCHULEK und STASIAK) oder durch Umsetzung mit Natriumazid in saurer Lösung (J. F. REITH[24])) entfernt werden. REITH verwendet ebenfalls Brom zur Titration, weil er behauptet, daß bei Anwendung von Chlor eventuell Bromat gebildet werden kann und dadurch Jod vorgetäuscht wird. Das Brom wird in saurer Lösung zugesetzt und auf dem Wasserbad weggekocht (PH etwa 1,6). Die Abweichungen sind bei der REITH'schen Methode bei Werten von 0,5 bis 1,5 γ Jod höchstens 5%, bei Werten von 1,5 bis 10 γ höchstens 2%.

III. Über die quantitative Bestimmung von anorganisch und organisch gebundenem Jod nebeneinander.

Es ist eine große Reihe von Versuchen angestellt worden, um über die Art der Bindung des Jods in den verschiedensten tierischen, pflanzlichen und auch mineralischen Produkten Aufschluß zu erhalten. Diese Aufgabe ist aber als eine der schwierigsten der analytischen Chemie zu bezeichnen, und die bisherigen Arbeiten auf diesem Gebiete sind nur als Vorversuche zu bezeichnen.

Bei einer Trennung von verschiedenen Jodverbindungen kann man entweder von der verschiedenen Löslichkeit oder aber von der verschiedenen Reaktionsfähigkeit der Verbindungen mit bestimmten Reagenzien Gebrauch machen.

So versuchte v. FELLENBERG[25]) über die Art der Bindung des Jods in den Böden dadurch einen Aufschluß zu erhalten, daß er das Jod in salzsäurelösliches und salzsäureunlösliches aufteilte. Nach diesem Verfahren arbeitete auch BLEYER[26]). J. BECK[27])

[24]) J. F. REITH, Rec. Trav. chim. Pays-Bas, *48*, 386 (1929).

[25]) V. FELLENBERG, Biochem. Zeitschr. *152*, 153 (1924).

[26]) B. BLEYER, Biochem. Zeitschr. *170*, 265 (1926).

[27]) W. GAUS und R. GRIESSBACH, „Jodfrage und Landwirtschaft", S. 95 (Sonderdruck aus: Zeitschr. Pflanzenernähr. Düngung, Abt. A. *13*, Heft 6 (1929).

teilte das Jod in den Böden in organisiertes und nichtorganisiertes ein.

Bei tierischen und pflanzlichen Produkten ist es von ganz besonderem Interesse, über die Art der Bindung des Jods Klarheit zu schaffen. Hier hat man versucht, eine Trennung der verschiedenen wasserlöslichen Jodverbindungen nach folgenden Methoden zu erreichen: 1. Durch die Unterschiede in der Löslichkeit der verschiedenen Jodverbindungen in organischen Lösungsmitteln (Blum und Grützner, v. Fellenberg, Lunde und Closs), 2. durch Ausfällung des anorganischen Jods mit Silbernitrat (Eschle, Oswald u. a.), 3. durch Entfernung des anorganischen Jods, nachdem man es mit einem Oxydationsmittel in freies Jod übergeführt hat (Okuda und Eto, v. Fellenberg u. a.), und 4. durch Ausfällung des organisch gebundenen Jods (Okuda und Eto, Hundeshagen, Kendall, Lunde und Closs u. a.).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben uns zu der untenstehenden Einteilung der in tierischen und pflanzlichen Organismen natürlich vorkommenden Jodverbindungen geführt.

Wir haben zuerst die leichtlöslichen, das heißt solche, die sich aus dem zu untersuchenden Material mit Wasser, Alkohol oder Aceton ausziehen lassen. Solche Verbindungen sind vor allem die im Zellsaft gelösten. Zu diesen leichtlöslichen Jodverbindungen gehören die wasserlöslichen anorganischen Jodverbindungen (z. B. lösliche Jodide und Alkalijodate) und wasserlösliche organische Jodverbindungen (jodhaltige Extraktivstoffe).

Von den wasserunlöslichen Jodverbindungen lassen sich einige mit fettlösenden, organischen Flüssigkeiten ausziehen, das sind Jodfette usw. Ferner gehören zu den wasserunlöslichen schwerlösliche anorganische Jodverbindungen (z. B. Erdalkalijodat) und die in der Gerüstsubstanz der Organismen fest gebundenen organischen Jodverbindungen.

Die Aufteilung des Jods in diese verschiedenen Fraktionen gestaltet sich nun wie folgt.

Extraktion mit Wasser. Die Substanz wird zuerst mit Wasser erschöpfend extrahiert. Diese Extraktion muß nach Möglichkeit bei gewöhnlicher Temperatur erfolgen, um eine Veränderung leichtzersetzlicher organischer Verbindungen zu verhindern. Wir gehen bei diesen Versuchen so vor, daß die Substanz zuerst nach Möglichkeit zerkleinert wird, worauf sie wiederholt mit frischem Wasser auf der Schüttelmaschine geschüttelt wird. Man

kann auch den feuchten Brei an einem kühlen Ort einfach stehenlassen und das Wasser von Zeit zu Zeit erneuern. Da diese letzteren Extraktionen meistens sehr viel Zeit in Anspruch nehmen, es vergehen oft mehrere Tage, bis die Extraktion vollständig ist, so muß man den Brei durch Überschichten mit geringen Mengen Toluol vor Fäulnis schützen. Die wässerigen Extrakte werden stets mit Toluol überschichtet.

Die Abtrennung der wässerigen Extrakte vom Rückstand bietet manchmal große Schwierigkeiten und wird im allgemeinen erst durch Zentrifugieren möglich. Die weitere Aufarbeitung des wässerigen Extraktes gestaltet sich verschieden, je nachdem welchen Zweck man bei der Untersuchung verfolgt.

Abtrennung des Fettjods. Man kann aus der wässerigen Lösung zuerst die Fette durch Ausschütteln mit Chloroform (nach v. FELLENBERG[28]) oder, wie wir gefunden haben, besser mit Äther entfernen. Die Lösung wird zu diesem Zwecke schwach sauer gemacht. Ist die wässerige Lösung zu verdünnt (das heißt zu jodarm), dann muß sie vor dem Ausschütteln mit Äther eingeengt werden. Das Einengen wird am besten im Vakuum vorgenommen (eventuell unter Zusatz von wenig Kaliumkarbonat). Die ätherische Lösung enthält elementares Jod, entweder von vornherein vorhandenes, oder solches das beim Ansäuern in Freiheit gesetzt wurde. Ferner enthält die Ätherlösung dasjenige Jod, das an Fette, bezw. an Lipoide gebunden ist. Diese Fraktion wird oft als „Lipoidjod" bezeichnet (VEIL und STURM[29]), LUNDE und CLOSS[30]). Über die Art der Bindung des Jods in dieser Fraktion wissen wir nichts ganz Bestimmtes; es ist wahrscheinlich, daß das meiste Jod in dieser Fraktion tatsächlich an Fette gebunden ist.

Bestimmung des anorganisch gebundenen Jods durch Oxydation. Im allgemeinen versucht man nun in der wässerigen Lösung nach dem Abtrennen des Äthers das anorganisch gebundene Jod (Jodid) dadurch zu bestimmen, daß man es mit einem Oxydationsmittel zu freiem Jod oxydiert und das ausgeschiedene Jod mit einem organischen Lösungsmittel ausschüttelt und quantitativ bestimmt. Von dem Oxydationsmittel muß man verlangen, 1. daß es Jodide quantitativ in Jod über-

[28]) TH. v. FELLENBERG, Ergebn. der Physiol., 25, 205 (1926).
[29]) W. H. VEIL und A. STURM, Dtsch. Arch. klin. Med., *147*, 166 (1925).
[30]) G. LUNDE und K. CLOSS, Norsk. Mag. Laegev., *1928*, 500.

führt, 2. daß die Oxydation nicht weiter als zur Stufe des elementaren Jods geht, und 3. daß es sich mit anderen Jodverbindungen als Jodiden nicht umsetzt.

Okuda und Eto[31]) bestimmten das anorganisch gebundene Jod in wässerigen Extrakten aus Algen in der Weise, daß sie die schwefelsaure Lösung mit Nitrit und Chloroform behandelten, und das mit Chloroform ausgeschüttelte Jod nach Fresenius[32]) bestimmten. v. Fellenberg (l. c., S. 205) setzte ebenfalls das Jod der Jodide mit Nitrit in Freiheit und schüttelte das ausgeschiedene Jod mit Chloroform aus. Das in der wässerigen Lösung zurückbleibende Jod faßt er als organisch gebunden auf und bezeichnet es als „organischer Rest". Nach diesem Verfahren arbeiteten auch Veil und Sturm (l. c.), Lunde und Closs[33]), Scharrer und Schwaibold[34]) u. a. Wir haben aber bereits früher darauf hingewiesen, daß eine Trennung nach diesem Verfahren nicht einwandfrei ist[35]). P. A. Meerburg[36]) hat auch kürzlich diese Trennungsmethode kritisiert. Er hat Versuche angestellt, wo er eine Trennung des organischen und anorganischen Jods in Wässern nach v. Fellenberg ausführte, und zwar unter Zusatz von einer bekannten Menge Jodid. Dabei stellte sich heraus, daß er zwar die Gesamtmenge des im Wasser enthaltenen und des zugesetzten Jods bei der Analyse wiederfindet, das zugesetzte Jodid war aber zu einem großen Teil „organisch" geworden. Meerburg erklärte dies in der Weise, daß das durch Nitrit ausgeschiedene Jod in statu nascendi auf ungesättigte organische Verbindungen, die im Wasser enthalten seien, einwirke und so in der wässerigen Lösung als organisch gebundenes Jod zurückbleibe. Neuerdings scheint v. Fellenberg sich dieser Auffassung angeschlossen zu haben[37]). Er schreibt aber: „Immerhin gibt es Fälle, wo dennoch das v. Fellenberg'sche Trennungsverfahren nicht wertlos ist. So konnte bei gewissen Meeresalgen und auch in manchen Kropfmitteln festgestellt werden, daß die Hauptsache des Jods anorga-

---

[31]) Y. Okuda und T. Eto, Journ. Coll. Agric. Tokyo, *5*, 341 (1916).

[32]) F. P. Treadwell, Analytische Chemie, II., 2. Auflage (1919), S. 559.

[33]) G. Lunde und K. Closs, Tidsskr. Kjemi Bergv., *8*, 33 (1928).

[34]) Scharrer und Schwaibold, Biochem. Zeitschr. *207*, 332 (1929).

[35]) G. Lunde, H. Closs, H. Haaland, S. O. Madsen, Aarsberetn. vedk. Norges Fiskerier, 1928, Nr. 4.

[36]) P. A. Meerburg, Zeitschr. physikal. Chem., *130*, 105 (1927).

[37]) Th. v. Fellenberg, Mikrochemie, *7 (N. F. 1)*, 261—62 (1929).

nisch gebunden war. Obgleich die Werte vermutlich etwas zu niedrig waren, gaben sie doch den gewünschten Einblick".

Wir können uns der Auffassung von MEERBURG durchaus nicht anschließen. Es erschien uns sehr unwahrscheinlich, daß das stundenlang eingekochte Wasser noch so reaktionsfähige Verbindungen enthalten sollte, die das elementar ausgeschiedene Jod aufzunehmen vermöchten. Es ist auch von verschiedener Seite behauptet worden, daß die Oxydation des Jodids mit Nitrit, wie sie bei dieser Trennung vorgenommen wird, zur Bildung von Jodat führen kann. Das Jodat würde in der wässerigen Lösung zurückbleiben und so als „organisches" Jod bestimmt werden. Es ist aber dies überhaupt nicht bewiesen worden, und Versuche von KARL CLOSS[38]) haben gelehrt, daß die Fehlergebnisse, die bei dieser Methode so oft eintreffen, auf eine ganz andere Ursache zurückzuführen sind. Der Grund für die Fehlergebnisse ist in den in Wässern und sonst zur Untersuchung kommenden wässerigen Flüssigkeiten stets vorhandenen Chloriden zu suchen. Diese bewirken Bildung von Chlorjod-Chlorwasserstoffsäure $H(JCl_2)$, die beim Ausschütteln mit Chloroform größtenteils in der wässerigen Lösung zurückbleibt. Die Menge der sich bildenden Chlorjod-Chlorwasserstoffsäure hängt von der Säurekonzentration sowie von der Nitritkonzentration ab, und zwar steigt die Menge mit der Säurekonzentration und mit der Nitritkonzentration, letzteres aber nur bis zu einem gewissen Grenzwert. Diese Reaktion ist mit der Darstellung von Jodmonochlorid JCl durch Auflösen von Jod in Königswasser nach BUNSEN[39]) direkt vergleichbar. Sie geht nicht weiter als zur Bildung von JCl. Die gebildete Chlorjod-Chlorwasserstoffsäure ist in Äther leichter löslich als in Wasser, kann daher mit Äther aus der wässerigen Lösung entfernt werden. Bei Anwendung von Äther an Stelle von Chloroform zur Ausschüttelung des in Freiheit gesetzten Jods wird also auch das gebildete Chlorjod mit aus der Lösung entfernt. Bei Anwendung von Äther fällt also diese Fehlerquelle fort.

Eine andere Fehlerquelle bei dem v. FELLENBERG'schen Trennungsverfahren, worauf er übrigens auch selbst hinweist, ist die, daß das Nitrit aus verschiedenen organischen Jodverbindungen

[38]) KARL CLOSS, Diss. München 1929, wird demnächst veröffentlicht.
[39]) R. BUNSEN, Liebigs Ann., *84*, 1 (1852).

Jod in Freiheit setzen kann. Dieses organisch gebundene Jod würde dann als „anorganisches" Jod zur Bestimmung gelangen. Bei der Verwendung von Wasserstoffsuperoxyd als Oxydationsmittel fällt diese Fehlerquelle größtenteils fort. Bei der Anwendung von Wasserstoffsuperoxyd ist auch die Bildung von Chlorjod viel langsamer als bei Anwendung von Nitrit.

Ausfällung des anorganischen Jods. Wie bereits erwähnt, kann man in der durch Extraktion des Untersuchungsmaterials erhaltenen wässerigen Lösung eine Abtrennung des anorganisch gebundenen Jods durch Ausfällen erreichen.

Als Fällungsmittel kommen im wesentlichen in Betracht: Silbernitrat, Palladiumchlorür, Kupfersulfat und ammoniakalisches Kupferchlorür. Wir haben gefunden, daß Kupfersulfat mit kleinen Jodmengen nicht quantitativ reagiert.

Silbernitrat wurde von ESCHLE[40]) und auch von OSWALD[41]) und anderen verwendet. Silbernitrat ist bei großen Mengen, wo man im Niederschlag eine Trennung der Halogene vornehmen kann, gut anwendbar. Bei kleinen Jodmengen beschränkt man sich im allgemeinen auf die Bestimmung des nicht gefällten Jods im Filtrat, da der Aufschluß des Niederschlages und die Bestimmung seines Jodgehaltes mit Schwierigkeiten verbunden ist.

Ein Nachteil des Verfahrens ist, daß wir keinerlei Garantie dafür haben, daß nur anorganisches Jod ausgefällt wird, da einerseits viele organische Verbindungen schwerlösliche Silbersalze liefern, anderseits die organischen Jodverbindungen zum Teil mit Silbernitrat unter Bildung von Silberjodid reagieren können.

Palladiumchlorür fällt in schwach salzsaurer Lösung von anorganischen Verbindungen außer Jodiden nur Cyanide. Reaktionen mit organischen Verbindungen, wie sie beim Silbernitrat eintreten, sind hier nicht in gleichem Maße bekannt. Außerdem kann das Jod sowohl im Niederschlag als auch im Filtrat leicht nachgewiesen werden, nachdem man das Palladium entfernt hat. Die Ausfällung des Jodids mit Palladium wird nach der allgemeinen Vorschrift vorgenommen[42]): „Man säuert die jodidhaltige

[40]) ESCHLE, Zeitschr. physiol. Chem., *23*, 30 (1897).
[41]) A. OSWALD, Zeitschr. physiol. Chem., *75*, 353 (1911).
[42]) F. P. TREADWELL, Analytische Chemie, II, 8. Aufl., *1919*, S. 283.

Lösung schwach mit Salzsäure an, fügt, solange eine Fällung entsteht, Palladiumchlorürlösung hinzu, läßt ein bis zwei Tage an einem warmen Orte stehen und filtriert den braunschwarzen Niederschlag von Paladiumjodür." Die Palladiumfällung wird in möglichst wenig Ammoniak gelöst und Schwefelwasserstoff in die Lösung eingeleitet. Beim Neutralisieren mit Salzsäure fällt Palladiumsulfid aus und wird durch Filtration entfernt. Das Filtrat wird durch Einleiten von Kohlensäure und kurzes Erwärmen vom Schwefelwasserstoff befreit. Dann macht man alkalisch und bestimmt das Jod wie üblich.

In das Filtrat von der Palladiumfällung wird Schwefelwasserstoff eingeleitet und das ausfallende Palladiumsulfid abfiltriert. Die weitere Aufarbeitung geschieht wie oben.

Ausfällung der Eiweißkörper. Man kann auch aus der wässerigen Lösung vor oder nach der Abtrennung des „Lipoidjods" und des anorganischen Jods solche Jodverbindungen entfernen, die sich durch Zusatz von organischen Lösungsmitteln ausfällen lassen. Hier kommen vor allem mit Alkohol oder Aceton koagulierbare, jodhaltige Eiweißkörper in Betracht.

Hierauf beruht die Trennung der Jodverbindungen im Blut nach v. FELLENBERG[43]). Diese Methode ist von uns weiter ausgebaut worden[44]). Wir verfahren wie folgt:

5 bis 10 ccm Blut werden mit einer vorher mit Citratlösung ausgespülten LUER'schen Spritze der Armvene entnommen. Das Blut wird sofort in einem etwa die vierfache Menge 96%igen jodfreien Alkohol enthaltenden Meßzylinder eingespritzt und gut durchgeschüttelt. Das fein verteilte Koagulat wird jetzt in eine Soxhlethülse eingefüllt und mit dem Alkohol etwa vier Stunden auf dem Wasserbad extrahiert. Das gesamte anorganisch gebundene Jod ist jetzt im Alkohol gelöst, während die in Alkohol unlöslichen Verbindungen, insbesondere die Eiweißkörper, in der Hülse zurückbleiben. Das Jod kann jetzt in beiden Fraktionen getrennt bestimmt werden.

BLUM und GRÜTZNER[45]) führen die Trennung mit Aceton aus. SCHARRER und SCHWAIBOLD (l.c.) fällen das an Eiweiß gebun-

[43]) TH. v. FELLENBERG, Ergebn. der Physiol., *25*, 207 (1926).

[44]) G. LUNDE, K. CLOSS und O. CHR. PEDERSEN, Biochem. Zeitschr., *206*, 261 (1929).

[45]) BLUM und GRÜTZNER, Zeitschr. physiol. Chem., *85*, 429 (1913), *91*, 392, 450 (1914).

dene Jod mit Alkohol. Okuda und Eto (l. c.) führen im wässerigen Extrakt von Algen Fällungen mit basischem Bleiacetat und auch mit Stutzer's Reagens aus.

Andere eiweißfällende Reagenzien können auch verwendet werden. Über diesbezügliche Versuche werden G. Lunde und K. Wülfert demnächst berichten. Man vergleiche auch Scharrer und Schwaibold (l. c.).

Andere Extraktionsmittel als Wasser. Häufig verwenden wir statt Wasser Alkohol oder Aceton für die erste Extraktion der organischen Substanz[46]). Die Extraktion mit diesen Lösungsmitteln kann so vorgenommen werden, wie oben bei der wässerigen Extraktion beschrieben. Besser extrahiert man im Soxhletapparat. Die Alkohol- und Acetonlösungen enthalten anorganisch gebundenes Jod sowie eine Reihe organischer Jodverbindungen. Man kann das Lösungsmittel unter Zusatz von Wasser und etwas Kaliumkarbonat abdestillieren (besser im Vakuum) und die wasserlöslichen Jodverbindungen wie oben weiter trennen.

Der Rückstand nach der Alkohol- oder Aceton-Extraktion wird mit verdünnter Salzsäure am Rückfluß erwärmt, wobei einerseits schwerlösliche anorganische Jodverbindungen (Erdalkalijodate usw.) in Lösung gehen, anderseits aus den Kohlehydratkomplexen der Zellwände durch Hydrolyse Jodverbindungen herausgelöst werden („Kohlehydratjod").

Zusammenfassung des Teiles III.

Die Substanz wird mit Wasser (Alkohol oder Aceton) erschöpfend extrahiert.

Fettjod wird aus saurer Lösung mit Äther entfernt.

Anorganisches Jod wird mit Nitrit oder Wasserstoffsuperoxyd in sehr schwach saurer Lösung (essigsaurer) in Freiheit gesetzt und mit Äther ausgeschüttelt.

Anorganisches Jod kann bei etwas größeren Mengen auch mit Palladiumchlorür in schwach saurer Lösung ausgefällt werden.

Eiweißjod wird mit eiweißfällenden Reagenzien ausgefällt.

[46]) G. Lunde, K. Closs, H. Haaland, S. O. Madsen, l. c., S. 35.

Eine einfache mikroanalytische Trennung von Chlor und Brom.

Von **Ludwig Moser.**

(Nach Versuchen von RUDOLF MIKSCH.)

(Mitteilung aus dem Inst. f. analyt. Chemie d. Technischen Hochschule in Wien.)

(Eingelangt am 8. März 1929.)

Es wurde bereits vor einiger Zeit dargetan, daß man die thermische Dissoziation der Ammoniumhalogenide in der quantitativen Analyse vielfach mit gutem Erfolge anwenden könne[1]). Während man früher nur die Einwirkung von Salmiakdampf in einigen wenigen Fällen nutzbar gemacht hatte, wobei der dabei entstehende Chlorwasserstoff in Reaktion trat, wurde gezeigt, daß der aus NH_4Br oder NH_4J gebildete trockene HBr oder HJ von viel größerer Wirkung ist als der unter ähnlichen Bedingungen entstandene HCl. Wenn wir das thermische Gleichgewicht

$$2\,HX = H_2 + X_2 \text{ (wobei X = Cl, Br oder J)}$$

betrachten, so wissen wir aus den Untersuchungen von BODENSTEIN und GEIGER[2]), daß HCl bei 327° so gut wie nicht dissoziiert ist, während das Gleichgewicht bei HBr schon etwas rechts, mehr aber noch bei HJ auf der rechten Seite der Gleichung liegt. Genau läßt sich sich dieser Unterschied durch Betrachtung der thermischen Dissoziationskonstanten der Abgase für diese Temperatur erkennen, die von den beiden Verfassern experimentell bestimmt worden sind, und zwar ist

$$K_{HCl} = 55 \cdot 10^{-18},\quad K_{HBr} = 3{,}2 \cdot 10^{-10} \text{ und } K_{HJ} = 1{,}36 \cdot 10^{-2}.$$

Die daraus errechneten Dissoziationsgrade ergeben in Prozenten:

$$1{,}5 \cdot 10^{-6},\ 3{,}5 \cdot 10^{-3} \text{ und } 18{,}9.$$

Man erkennt also, daß HCl bei der Versuchstemperatur, denn diese beträgt ungefähr 300°, praktisch fast nicht dissoziiert ist, dagegen ist HBr etwa 2000mal und HJ rund 12millionenmal mehr zerfallen. Dadurch ist aber die eigenartige Wirkung der beiden

[1]) L. MOSER und S. MARIAN, Ber. 59 (1926) 1335.

[2]) BODENSTEIN und GEIGER, Z. f. Phys. Ch. 49 (1904) 80.

letzteren Halogenwasserstoffe aufgezeigt und ihre thermische Überlegenheit gegenüber dem HCl verständlich, denn es ist klar, daß der durch die Spaltung entstehende Wasserstoff, dessen Entwicklung solange erfolgt, als unzersetztes NH_4Br oder NH_4J vorhanden sind, in größter Menge zur Verfügung steht. Eben dadurch kommt die ausgezeichnete Reduktionswirkung dieser beiden Verbindungen zustande, so daß, wie seinerzeit gezeigt wurde, $KClO_4$ oder Alkalisulfat schon durch zweimaliges Abrauchen mit ganz wenig Ammoniumbromid oder, noch besser, mit Ammoniumjodid reduziert werden können.

Nach ähnlichen Grundsätzen ist es möglich. AgCl oder AgBr in AgJ überzuführen, so daß man dadurch sowohl die Möglichkeit einer Überprüfung der Reinheit dieser Verbindungen wie auch die einer Trennung von Chlor und Brom besitzt.

Arbeitsvorschrift.

Das durch Fällung in der üblichen Weise erhaltene AgCl oder AgBr wird unter Verwendung eines Mikro-Gooch-Neubauertiegels filtriert, kalt gewaschen und der Niederschlag bei etwa 150° getrocknet. Nun erfolgt das Zumischen der ungefähr sechsfachen Gewichtsmenge von trockenem, rückstandsfreiem NH_4Br oder NH_4J. Der zuerst bedeckte und später offene Tiegel wird im Muffelofen auf 250 bis 300° solange erhitzt, bis alles Ammoniumsalz verflüchtigt ist. Dieser Vorgang wird meist einmal (Gewichtskonstanz), selten zweimal wiederholt, um alles AgCl in AgBr oder AgJ, oder AgBr in AgJ überzuführen.

Angew.		Berechnet		Gefunden	
AgCl	3,700 mg	AgBr	4,848 mg	AgBr	4,860 mg
„	3,700 „	„	4,848 „	„	4,855 „
„	3,700 „	AgJ	6,061 „	AgJ	6,049 „
„	3,700 „	„	6,061 „	„	6,060 „

Angew.				Berechnet		Gefunden	
AgCl	2,220 mg	AgBr	2,442 mg	AgBr	5,351 mg	AgBr	5,447 mg
„	1,480 „	„	3,256 „	„	5,195 „	„	5,183 „
„	2.960 „	„	3.256 „	AgJ	8,920 „	AgJ	8,875 „
„	1,480 „	„	2,442 „	„	5,477 „	„	5,470 „
„	2,960 „	„	1,628 „	„	6,884 „	„	6,900 „

Wie aus den Analysenwerten hervorgeht, eignet sich die oben beschriebene einfache Methode zu einer mikroanalytischen indirekten Trennung von Chlor- und Bromion.

In weiterer Folge wurden Versuche gemacht, den Platin-Gooch-Neubauertiegel durch einen Porzellansintertiegel zu ersetzen. Hierbei konnte man aber feststellen, daß ein solcher Tiegel keine Anwendung finden könne, da es selbst unter strengster Beobachtung verschiedener Vorsichtsmaßregeln (wie Einhaltung derselben Trockenzeiten, Abkühlungszeiten, Wägung im verschlossenen Wägegläschen) nicht gelang, Gewichtskonstanz zu erzielen. Nach diesen Erfahrungen scheint die Verwendung des in der Makroanalyse bewährten Porzellansintertiegels in der Mikroanalyse überhaupt nicht angängig.

Eine Methode zur quantitativen mikrochemischen Bestimmung des Silbers in Blut und Organen *.

Von **L. Pincussen** und **W. Roman.**

(Aus dem biolog.-chem. Institut d. städtischen Krankenhauses Am Urban, Berlin.)

(Eingelangt am 19. April 1929.)

Zur Bestimmung des Silbers bedient man sich im allgemeinen entweder der gravimetrischen Methode oder der Titration nach VOLHARD mit Rhodanammonium in salpetersaurer Lösung mit Eisenammonalaun als Indikator. Von F. PREGL[1]) ist die gravimetrische Bestimmung des Chlors in organischen Substanzen als Silberchlorid auf die mikrochemische Bestimmung ausgedehnt und hier bis zum genauen Nachweis einer Differenz von zirka 10 γ[2]) Cl ausgearbeitet worden. Diese Methode bietet jedoch Schwierigkeiten, sobald es sich nicht um den Nachweis von Chlor oder anderen Halogeniden, sondern um S i l b e r in der organischen Substanz handelt. Da in diesem Fall das Silberchlorid bereits während der Verbrennung der organischen Substanz vorhanden ist, kann es sich in dem Perlrohr festsetzen, besonders, wenn es sich um kleinere Mengen handelt, woraus es sich dann schwer herausspülen lassen würde. Außerdem lassen sich auch kleinere Mengen als 10 γ bei der Wägung auf der Mikrowaage auch bei der Differenzwägung nicht erkennen.

Aus diesem Grunde versuchten wir, das Silber auf titrimetrischem Wege zu bestimmen. Titrimetrisch läßt sich Silber noch in außerordentlich geringen Mengen mit großer Genauigkeit bestimmen, da der Umschlag von weiß oder gelblich zu rot oder rosa außerordentlich scharf ist und noch in sehr verdünnten Lösungen erkannt werden kann. So konnten wir z. B. 1 ccm einer Silbernitratlösung, die in 1 ccm 1 γ Ag enthielt, mit einer mittleren Genauigkeit von $\pm 3\%$ mit einer n/1000-Rhodanammonlösung aus einer Mikrobürette nach PINCUSSEN[3]) titrieren. Es ist nur darauf

*) Die Untersuchung wurde mit Unterstützung der Notgemeinschaft der deutschen Wissenschaft ausgeführt.

[1]) PREGL zit. nach H. LIEB in Fermentmethodik (Leipzig 1929).

[2]) $1\,\gamma = 0{,}001$ mg.

[3]) L. PINCUSSEN, Biochem. Zeitschr. 186, 32, 1927.

zu achten, daß die Säurekonzentration nicht zu groß und soviel Indikator vorhanden ist, daß die Lösung schwach gelb — aber nicht bräunlich — gefärbt erscheint, damit die Indikatorkonzentration hinreichend groß ist, um mit dem geringsten Überschuß der schwachen Rhodanlösung eine Rotfärbung zu erzeugen.

Will man Silber bestimmen, das durch Einspritzung oder auf andere Weise in den Organismus gelangt ist, so stößt man auf die Schwierigkeit, daß das Silber durch den großen Überschuß an Chlor-Ionen, der in jeder Organsubstanz und im Blute vorhanden ist, als Silberchlorid gefällt wird. Es gelang uns nun, festzustellen, daß sich das Silberchlorid nach Veraschung der organischen Substanz durch heiße, ammoniakalische Traubenzuckerlösung auch in so kleinen Mengen, wie sie im mikrochemischen Nachweis vorkommen, quantitativ zu Silber reduzieren läßt. Das Silber kann nach Entfernung des Chlors in Salpetersäure gelöst und nach VOLHARD, wie oben beschrieben, titriert werden.

Ausführung der Bestimmung.

1 bis 5 ccm[4]) des silberhaltigen Blutes oder 1 bis 5 g der Silber enthaltenden frischen Organsubstanz werden in einem Zentrifugenrohr aus Porzellan[5]) mit zirka 2 ccm konzentrierter Salpetersäure, 4 bis 5 Tropfen Perhydrol[6]) und sicherheitshalber noch einigen Tropfen verdünnter HCl übergossen und über ganz kleiner Flamme auf dem Sandbad zirka eine Stunde erhitzt. Die Veraschung muß sehr vorsichtig geschehen, da das Gemisch leicht überschäumt. Die Lösung muß nach Beendigung der Veraschung hellgelb sein, ist jedoch nicht immer ganz klar, sondern kann außer dem Chlorsilber leichte, weißliche Flocken enthalten, die aber den Fortgang der Analyse nicht stören, da sie sich jetzt bei der Zugabe von Wasser in diesem ohne weiteres auflösen. Es wird nach Verdünnung mit Wasser zehn Minuten scharf abzentrifugiert und die überstehende klare Lösung vorsichtig abgegossen. Man gießt einige ccm Wasser darauf, rührt den Niederschlag auf, zentrifugiert wieder scharf ab und gießt das Waschwasser weg. Diese Waschung

[4]) Mehr als 5 ccm Blut oder 5 g Substanz lassen sich in einem Zentrifugenrohr schlecht veraschen.

[5]) L. PINCUSSEN und ARINSTEIN, Chemiker-Zeitung 1925. S. 980.

[6]) Statt des Perhydrols kann auch Kaliumpermanganat in kalt gesättigter Lösung angewandt werden, das während der Veraschung tropfenweise zugesetzt wird.

ist so oft zu wiederholen, bis das Waschwasser mit zugefügter Salpetersäure und Silbernitratlösung keine Trübung mehr gibt, der Niederschlag also chlorfrei gewaschen ist. Jetzt fügt man zu dem Niederschlag im Zentrifugenrohr zirka 1 ccm konzentriertes Ammoniak und zirka 10 ccm kochende 25%ige Traubenzuckerlösung hinzu. Die Traubenzuckerlösung, welche nicht älter als zwei Tage sein darf, da sonst ihre Reduktionskraft geschwächt ist, muß unbedingt siedend zugegossen werden. Nun wird wieder abzentrifugiert. Die Silberkörnchen haben sich am Boden abgesetzt und die Lösung muß jetzt klar sein. Bei Bestimmung größerer Silbermengen über 1 mg Ag in der Analysenlösung kann die Lösung durch kolloidal gelöst gebliebenes Silber braun gefärbt erscheinen. In diesem Fall ist nach Zufügung von zirka 0,1 bis 0,5 g festem Magnesiumsulfat nochmals längere Zeit scharf zu zentrifugieren, wodurch das Silber quantitativ ausgeflockt wird. Die klare überstehende Lösung wird abgegossen und nach Zufügen von Wasser und Aufrühren des Niederschlages wieder zentrifugiert. Jetzt wird das Silber in 1 ccm verdünnter Salpetersäure, nötigenfalls unter Erwärmen, gelöst, die Lösung in ein kleines Erlenmeyer-Kölbchen gespült und unter Zusatz einiger Körnchen Eisenammonalaun, wie oben beschrieben, mit Rhodanammon titriert.

Man kann die Veraschung auch bei vorsichtigem Erhitzen auf dem Sandbad in einem unten spitzen Zentrifugenglas aus Jenaer Glas ausführen, in dem dann auch die weiteren Arbeiten vorgenommen werden und auch gleichzeitig titriert werden kann.

Es lassen sich auf diese Weise noch 10 γ Silber in Blut oder Organsubstanz mit einem Fehler von 2% bestimmen.

Testanalysen.

I. Zweimal je 5 ccm Blut wurden mit je 0.1 ccm einer n 1000-Silbernitratlösung vermischt, analysiert und ergaben bei der Titration einen Verbrauch
von 0,10 ccm n/1000-Rhodanammonlösung entspr. . 10,7 γ Ag
bzw. v. 0,102 ccm n/1000-Rhodanammonlösung entspr. 10.9 γ Ag
statt theoretisch . . . . . 10,7 γ Ag

II. Zweimal je 3 g Leber wurden mit je 0,1 ccm derselben Silbernitratlösung vermischt, analysiert und ergaben bei der Titration einen Verbrauch

von 0,10 ccm n 1000-Rhodanammonlösung entspr. . 10,7 γ Ag
bzw. v. 0,099 ccm n 1000-Rhodanammonlösung entspr. 10,6 γ Ag
statt theoretisch . . . . . 10,7 γ Ag

III. 5 ccm Blut wurden ohne Silberzusatz analysiert und ergaben bei der Titration mit dem ersten Tropfen Rhodanammon Rotfärbung.

A Micro Method for the Estimation of Chlorides in Blood.

By **William B. Rose** and **Charles J. Stucky.**

(From the Laboratory of Physiological Chemistry, Yale University, New Haven, Connecticut.)

The authors have used the method of VAN SLYKE[1]) (1923) for the estimation of whole blood chlorides, with satisfactory results. In this method one cubic centimeter of blood is required for a single determination. During the course of other experiments, only small quantities of blood were available for the estimation of blood chlorides; consequently the VAN SLYKE method was modified to permit the estimation of chlorides in one-tenth of a cubic centimeter of whole blood. The details of this micro method are here described.

Reagents.

(1) Standard Silver Nitrate. — This solution contains 2.905 grams per liter. It is prepared by dissolving the C. P. salt in a small quantity of distilled water and making up to volume with concentrated nitric acid (Sp. gr. 1.42). 1 c. c. of this solution = 1 mg. NaCl.

(2) Potassium Thiocyanate. — A water solution containing 0.554 gm. per liter. Prepared by standardization against the silver nitrate solution. 3 c. c. of this solution = 1 c. c. of the standard $AgNO_3$.

(3) Indicator. — A saturated solution of ferric alum[2]) is used as an indicator in the titrations of the excess silver with KCNS.

Procedure.

One-tenth cubic centimeter of whole blood is measured by means of a micro-pipette and discharged into 1 c. c. (approximately) of distilled water contained in a pyrex test tube. The pipette is rinsed thoroughly by filling and emptying several times with the liquid in the tube and then 1 c. c. of the standard $AgNO_3$ solution

[1]) VAN SLYKE, D. D., 1923, Jour. Biol. Chem., VIII, 523.

[2]) BAKER's analyzed ferric alum was employed.

is added. A series of determinations may be run simultaneously. The tubes are then placed in a large pyrex beaker (the latter covered with a glass plate), and heated over a water bath until the proteins are completely digested and the supernatant liquid is clear. The precipated AgCl is coagulated by heating carefully over a free flame. Then 1 c. c. of the saturated solution of ferric alum is added, the material cooled, and the excess silver titrated with the standard K C N S solution until a salmon-pink color is obtained. For convenience and accuracy in titration, a 2 c. c. microburette is employed[3]). Blank determinations should always be run as a check on the reagents.

Calculation. — If T represents the number of c. c. of standard K C N S solution used in titrating the excess silver, then $1000\ (1 - T/3) =$ mg. of NaCl per 100 c. c. of blood, when 0.1 c. c. of blood is used for the estimation.

Duplicate analyses usually agreed within 1%. NaCl added to various blood samples was recovered to the extent of 98—99%. The results obtained compared favorably with the method of Van Slyke but were somewhat higher due to the fact that the micro-pipettes had been previously calibrated for "blow-out" rather than "wash-out" delivery.

In the method described by Rehberg[4]) (1926), the proteins are destroyed with hydrogen peroxide, ether is then added to facilitate the coagulation of the AgCl and air is bubbled through the mixture during the titration. The authors believe the procedure described above is somewhat simpler.

---

[3]) The micro-pipettes and micro-burette used in this procedure require accurate calibration.

[4]) Rehberg, P. B., 1926, Biochem. Jour., XX, 483.

Mikrochemischer Nachweis und Lokalisations-Ermittlung von Glykosiden.

Von **L. Rosenthaler.**

(Aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Bern.)

(Eingelangt am 10. Juni 1929.)

Der mikrochemische Nachweis von Glykosiden lehnt sich eng an den makrochemischen an und ist von verschiedener Sicherheit, je nachdem es sich um den Nachweis eines bereits in reinem Zustand isolierten Glykosids, um den Nachweis eines unreinen oder in einem Gemisch befindlichen Glykosids oder gar um den Nachweis in einem pflanzlichen Schnitt oder einem Pflanzenpulver handelt. Im ersten Fall wird die Kombination von physikalischen (Mikroschmelzpunkt, Bestimmung des Kristallsystems, Brechungsindex) und chemischen Methoden rasch mit Sicherheit zum Ziele führen, in den beiden anderen Fällen wird der Nachweis mit Sicherheit in vielen Fällen nur dann gelingen, wenn bereits durch makrochemische Untersuchungen feststeht, daß das mikrochemisch nachzuweisende Glykosid vorhanden ist, ein Fall, der in der Regel bei der Aufgabe der Lokalisationsermittlung vorliegt.

Von den auch mikrochemisch geeigneten Verfahren zum Nachweis von Glykosiden seien folgende erwähnt:

I. Hydrolyse mit nachfolgendem Nachweis des Aglykons. Die Hydrolyse kann vorgenommen werden: 1. durch Enzyme; 2. durch Kochen mit Säuren; 3. durch Mikrosublimation.

1. Besonders elegant fällt der mikrochemische Nachweis durch enzymatische Hydrolyse in jenen Fällen aus, in denen, wie bei den Blausäure- und Senfölglykosiden das Aglykon flüchtig ist; von anderen Fällen sei der WASICKY'sche Nachweis von Oxymethylanthrachinonglykosiden mit Hilfe des Rhabarber-Enzyms erwähnt.

2. Die Hydrolyse mit Säuren wird dann herangezogen werden, wenn das Aglykon in Wasser unlöslich ist, z. B. bei Salicin, den Saponinen, Digitalis- und Strophanthus-Glykosiden.

3. Ein während der Mikrosublimation zerfallendes Glykosid ist das Arbutin. Es ist leicht, sein Aglykon Hydrochinon in den Sublimaten nachzuweisen[1]).

[1]) Eine Mikrosublimation unzersetzter Glykoside ist wohl bei gewöhnlichem Druck ausgeschlossen, dürfte aber bei sehr niedrigem Druck zu erreichen sein.

II. Farbenreaktionen.

1. Allgemeine Kohlenhydratreaktionen (z. B. die MOLISCH'sche Reaktion mit α-Naphthol und Schwefelsäure) sind selbstverständlich nur in solchen Fällen zu verwenden, in denen Kohlenhydrate völlig ausgeschlossen sind, um so mehr, da sie hohe Empfindlichkeit besitzen.

2. Spezielle Reaktionen.

a) Reaktionen mit konzentrierter Schwefelsäure mit Zusätzen (Ammonmolybdat, Ammonvanadat, selenige Säure und dergl.) oder ohne solche werden sehr häufig angewandt und sind in vielen Fällen brauchbar, so beim Nachweis von Salicin, Strophanthin und den Saponinen.

b) Reaktionen mit Alkalien: Beispiel die BORNTRÄGER'sche Reaktion, angewandt auf Oxymethyl-anthrachinonglykoside.

c) Reaktionen mit Ferrichlorid. Sie finden Verwendung zum Nachweis von Phenolglykosiden, sind aber meist nicht empfindlich genug, um mikrochemisch verwendet werden zu können.

d) Salpetersäure wurde von TUNMANN zum Nachweis von Arbutin verwandt.

III. Fällungsreaktionen.

1. Allgemeine Fällungsmittel. Die allgemeinen Alkaloidfällungsmittel (Tannin, Brombromwasserstoff, Silikowolframsäure und dergleichen) fällen auch viele hochmolekulare Glykoside; dieselben Glykoside lassen sich auch zum Teil mit Ammonsulfat aus ihren wässerigen Lösungen ausfällen.

2. Spezielle Fällungsmittel.

a) Metallsalze, Erdalkalien und dergleichen können zur Fällung von Glykosiden mit sauren Eigenschaften dienen, so Bleiessig oder Barytwasser zur Fällung vieler Saponine.

b) Sterine können zur Fällung von Digitonin und einigen anderen saponinähnlichen Glykosiden verwendet werden.

c) Nitrosodimethylanilin kann in einzelnen Fällen zur Fällung von Phenolglykosiden herangezogen werden. Beispielsweise gibt Arbutin damit ein sehr charakteristisches Additionsprodukt.

d) Überführung in schwer lösliche Derivate des Glykosids oder Aglykons. Hierher gehört unter anderem der Nachweis des Aesculins mit Hilfe von Chlor- oder Bromderivaten.

IV. Biologische Reaktionen. Genannt sei die Auflösung roter Blutkörperchen, die sich bei Abwesenheit anderer

hämolysierender Stoffe zum mikrochemischen Nachweis hämolysierender Glykoside verwenden läßt.

Trotz der zahlreichen im Vorhergehenden skizzierten Hilfsmittel zum mikrochemischen Nachweis von Glykosiden ist die Ermittlung der Lokalisation der Glykoside, also ihr Nachweis an ihrem ursprünglichen Ort in der Zelle noch mit vielen Schwierigkeiten verknüpft.

Am einfachsten liegt die Sache, wenn ein Glykosid in der lebenden Zelle bereits auskristallisiert, wie dies Brunswik bei Anthurium Binotii beobachtet hat; auch in denjenigen Fällen, in denen die Glykoside beim Austrocknen der Pflanzenteile kristallisieren, wie so oft in der Hesperidingruppe, dürfte der Ort der Kristalle identisch sein mit dem des ursprünglich gelösten Stoffes. Nicht ganz so sicher ist dies, wenn die Überführung in den festen Zustand durch Weingeist und dergleichen geschieht. Im übrigen bietet gerade die Gruppe der Hesperidine ein Beispiel dafür, wie falsch es ist, aus dem Aussehen solcher Kristalle und einigen oberflächlichen Reaktionen auf die Gegenwart eines bestimmten Glykosides zu schließen. Denn die meisten der so als Hesperidin angesprochenen Kristalle haben sich nicht als Hesperidin erwiesen. In manchen Fällen lassen sich kristallinische Fällungen in der Zelle auch durch plasmolysierende Mittel erzielen. Aber auch, wenn dies nicht der Fall ist, wendet man die Plasmolyse häufig als vorbereitende Maßnahme an, da dadurch die Lokalisationsermittlung mit Hilfe spezifischer Reagenzien erleichtert und sicherer wird. In allen Fällen, in denen die Ermittlung der Lokalisation durch chemische oder biologische Reaktionen versucht wird, müssen Kontrollproben mit Schnitten vorgenommen werden, in denen das Glykosid durch ein geeignetes Lösungsmittel (in der Regel genügt wiederholtes Auskochen mit verdünntem Weingeist) entfernt wurde. Nur so ist es einigermaßen möglich, sich vor Irrtümern zu schützen. Überhaupt muß darauf hingewiesen werden, daß einwandfreie Lokalisationsermittlungen durchaus nicht so leicht sind, wie sich dies manche Autoren vorstellen. Ganz abgesehen von der durch Liesegang behandelten Frage, ob man berechtigt ist, aus dem Ort einer im kolloiden Medium erzeugten Fällung auf den ursprünglichen Ort des gefällten Körpers zu schließen, liegen auch in der Art der Reaktionen nicht

wenige Fehlerquellen. Darauf wird auch in den weiteren Ausführungen hingewiesen werden.

I. Hydrolyse mit nachfolgendem Nachweis des Aglykons. Unter den hier vorliegenden Möglichkeiten kommt für die Lokalisationsermittlung in erster Linie die enzymatische Hydrolyse in Betracht. Sie ist beispielsweise von ROSENTHALER und SEILER zum Nachweis der Lokalisation von Blausäureglykosiden verwendet worden, indem sie die frei werdende Blausäure auf mit ein wenig Jod imprägnierte Stärkekörner einwirken ließen.

II. Von den Farbenreaktionen sind die vielfach angewandten allgemeinen Kohlenhydratreaktionen völlig abzulehnen, da sie eben außer mit den Glykosiden mit den stets vorhandenen Kohlenhydraten reagieren. Auch die Reaktionen mit konzentrierter Schwefelsäure führen infolge des Eintretens der RASPAIL'schen (Kohlenhydrat-Eiweiß-Reaktion) häufig zu Irrtümern. Auch dadurch ist die konzentrierte Schwefelsäure wenig zu Lokalisationsermittlungen geeignet, daß sie die Stoffe rasch herauslöst und so die Färbungen auch in Zellen auftreten läßt, in denen das Glykosid nicht ursprünglich vorhanden war und außerdem dadurch, daß sie zarte Schnitte rasch zerstört. Die zuletzt genannten Nachteile lassen sich in vielen Fällen dadurch vermeiden, daß man die Schwefelsäure mit Wasser oder Weingeist verdünnt. So verwendet man zum Nachweis des Strophanthins eine 80%ige Schwefelsäure; bringt man einen Schnitt durch das Rhizom von Polygonatum multiflorum in ein Gemisch gleicher Teile Weingeist und Schwefelsäure, so sieht man, daß einzelne Zellen sich rot färben, während bei Anwendung konzentrierter Schwefelsäure größere Partien des Rindengewebes diese Färbung zeigen. Bei den Reaktionen mit Alkalien ist es häufig von Vorteil, hochkonzentrierte Laugen, besonders auch weingeistige, zu verwenden, da dann die Möglichkeit vorliegt, daß die Farbenreaktion an der schwerlöslichen Alkaliverbindung eintritt. Noch sicherer ist die Verwendung von gasförmigem Ammoniak. Reaktionen mit Ferrichlorid sind in allen denjenigen Fällen zur Bestimmung der Lokalisation von Glykosiden ungeeignet, in denen noch andere mit Ferrichlorid reagierende Stoffe, besonders die so weit verbreiteten Gerbstoffe zugegen sind.

Auch die Anwendung von Salpetersäure ist, soweit man sie durch Nitrierung zur Erzeugung gelb gefärbter Derivate verwenden will, mit Vorsicht zu beurteilen, da sich derartige Stoffe

bekanntlich aus zahlreichen aromatischen Derivaten bilden; doch kann man sich auch hier in manchen Fällen dadurch helfen, daß man eine verdünnte Salpetersäure verwendet.

III. Von den Fällungsreagenzien sind die allgemeinen Alkaloidfällungsmittel auch bei Abwesenheit von Basen nur mit großer Vorsicht zu benutzen, da sie außer den bereits erwähnten höheren Kohlenhydraten auch Eiweißstoffe ausfällen. Doch sind sie in eiweißarmen, aber glykosidreichen Zellen mit Erfolg anzuwenden: daß auch Fällungen mit Ammonsulfat oder anderen Neutralsalzen kritisch beurteilt werden müssen, bedarf keiner weiteren Erörterung.

Von den speziellen Fällungsmitteln sind weder Metallsalze noch Erdalkalien spezifische Glykosidfällungsmittel, da sie ja auch mit organischen Säuren schwerlösliche Salze bilden können. Bei deren Abwesenheit sind sie in vielen Fällen recht geeignet, so zum Nachweis der Lokalisation von Saponinen durch das Verfahren von COMBES. Sollen Schwermetallverbindungen von Glykosiden indirekt nachgewiesen werden, etwa dadurch, daß man sie nach Auswaschen des Reagens in Sulfide oder andere gefärbte Metallverbindungen überführt, so wirkt es häufig störend, daß manche Elemente der Gewebe, so schon die Zellulosewände Schwermetalle adsorbieren.

Die Fällungen mit Sterinen geben, soweit mir bekannt, in chemischer Hinsicht nicht zu Irrtümern Veranlassung; ihre Verwendung zur Lokalisationsermittlung ist jedenfalls mit Vorsicht zu beurteilen, da die Doppelverbindungen beim Nachweis von Sterinen mit Digitonin auch am Rand der Schnitte zu beobachten sind und wohl auch im umgekehrten Fall damit gerechnet werden muß, daß die Verbindung nicht am ursprünglichen Ort auftritt.

Nitrosodimethylanilin gibt auch Fällungen mit Gerbstoffen, ist also, wenn solche anwesend sind, nicht zu verwenden.

Die Überführung der Glykoside in Halogenderivate kann zur Lokalisationsermittlung dann mit Sicherheit herangezogen werden, wenn die Halogene in gasförmigem Zustand verwendet werden.

Bei der Verwendung der Hämolyse ist es ausgeschlossen, den Nachweis der Lokalisation für die einzelne Zelle zu führen; sie gestattet aber bei Verwendung von Blutgelatine (KOFLER,

Fischer) den Nachweis in einzelnen abtrennbaren Gewebekomplexen.

Ein Fortschritt über das bisher Erreichte hinaus dürfte weniger auf chemischem als auf mechanischem Gebiete zu erreichen sein, besonders durch Verwendung des Mikromanipulators. Gelingt es, mit dessen Hilfe einzelne Zellen oder sehr kleine Zellkomplexe zu isolieren, so lassen sich zur Ermittlung der Lokalisation — dies gilt nicht nur für Glykoside — manche bisher nicht mit Sicherheit zu verwendende Reagenzien gebrauchen und das ganze Gebiet wird eine zuverlässige Grundlage erhalten.

Die Mikrobestimmung des Koffeins im Kaffee.

Von **A. C. Röttinger.**

(Wien.)

(Eingelangt am 16. Mai 1929.)

Schon vor zwei Jahren habe ich eine Mikrobestimmung des Koffeins veröffentlicht[1]), es hat sich aber gezeigt, daß diese Methode bei sogenannten „koffeinfreien" Kaffeesorten zu hohe Werte lieferte. Die Methode wurde deshalb entsprechend vervollkommnet und sei nun in ihrer neuen Form mitgeteilt.

Was die Wahl der Methode betrifft, so wurden seinerzeit Versuche angestellt, die zu folgenden Ergebnissen führten:

1. Die direkte Extraktion des Kaffeepulvers mit organischen Lösungsmitteln ist der Herstellung eines wässerigen Aufgusses und Extraktion des letzteren vorzuziehen.

2. Die Bestimmung des Reinkoffeins im abgeschiedenen Rohkoffein wird zweckmäßiger durch eine KJELDAHL-Bestimmung, als durch Reinigen und Wägen vorgenommen.

3. Die Extraktion des Kaffeepulvers kann ebensogut im Soxhlet-Apparat erfolgen, wie auch — einfacher — durch halbstündiges Schütteln mit der 20fachen Menge Lösungsmittel und Verarbeiten eines aliquoten Anteils des Filtrates. Hingegen gibt die Extraktion des mit Wasser zu einem Brei angerührten Kaffeepulvers im Perforator wesentlich zu niedere Werte.

4. Die Befeuchtung des Kaffeepulvers mit Ammoniak ist der einfachen Wasserbefeuchtung vorzuziehen.

5. 1 Teil Koffein löst sich in zirka 55 Teilen neutralen Wassers und in zirka 14 Teilen salzsäurehaltigen Wassers. Der neutralen Koffeinlösung kann durch einmaliges Ausschütteln mit dem gleichen Volumen Chloroform zirka 9 Zehntel des Koffeingehaltes entzogen werden, der salzsauren Koffeinlösung nur zirka 7 Zehntel.

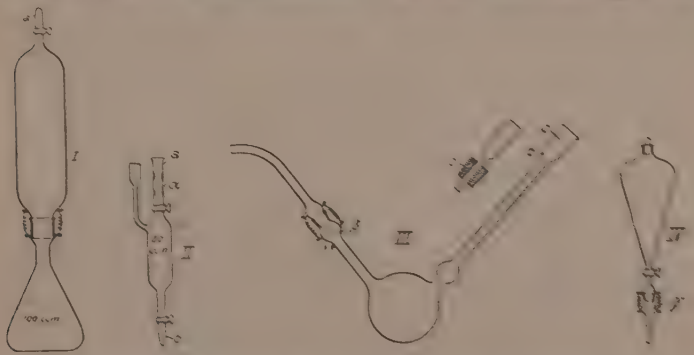
Auf diesen Versuchsergebnissen wurde die im nachstehenden beschriebene Methode seinerzeit aufgebaut. Es hat sich nun gezeigt, daß das bei ihrer Anwendung zuletzt erhaltene Rohkoffein, in welchem die KJELDAHL-Bestimmung durchgeführt werden soll, sehr geringe Mengen stickstoffhaltiger Verunreinigungen mit sich führt, die zwar bei der Analyse gewöhnlicher Kaffeesorten das

[1]) Ztschr. für Untersuchung d. Lebensmittel 1927, Bd. 53, pag. 146.

Resultat nicht beeinflussen, bei den sogenannten „koffeinfreien" Kaffees, deren Koffeingehalt auf 0,01% genau angegeben werden soll, aber nicht mehr außer acht gelassen werden dürfen, weil ihre Menge im Verhältnis zum Koffein etwa 20mal so hoch ist wie im ersten Fall. Es war daher nötig, vor der KJELDAHL-Bestimmung noch eine Reinigung des Koffeins einzuschalten.

Ausführung der Methode:

10 bis 20 g Kaffee werden möglichst fein gemahlen und gut durchgemischt. Davon werden genau 5 g am besten in einem geräumigen Aluminiumschiffchen abgewogen, in das mit Hahn versehene Teilstück des Schüttelgefäßes (Fig. I) gebracht und mit 5 ccm 10%igem Ammoniak durchfeuchtet. Dann werden in den anderen Teil des Schüttelgefäßes 100 ccm Chloroform bis zur



Marke eingefüllt, die beiden Teile am schwach eingefetteten Schliff zusammengesteckt, mit den Drahtspiralen versehen und eine halbe Stunde auf der Schüttelmaschine oder in der Hand geschüttelt. Dann wird das Gefäß mit dem Hahn nach abwärts eingeklemmt, die Bohrungen im Schliff zur Deckung gebracht, die 20 ccm fassende Pipette (Fig. II) angesetzt, die bei a mit einem losen Wattepfropf beschickt wurde, und durch entsprechendes Öffnen der Hähne die Pipette gefüllt. Durch diese Anordnung wird eine Konzentrationsänderung durch Verdunsten von Chloroform praktisch vermieden. Die Pipette wird ebenso an den Schliff b des Kugelgefäßes (Fig. III) angesetzt und in dasselbe entleert und nachgespült; sie ist auf Einguß geeicht. Zwischen den Schliffen β sitzt ein lockerer Wattebausch. Das Kugelstück wird in ein Wasser-

bad geklemmt und nach Einfügung einiger sehr kleiner ausgeglühter Tonsplitter wird das Chloroform abgedunstet, indem man bei der Tulpe c ein Glasrohr mittels Korkes einsteckt und an die Pumpe anschließt. Um das Chloroform nicht zu verlieren, leitet man zweckmäßig den chloroformhaltigen Luftstrom durch den vom Autor an anderer Stelle[2]) beschriebenen Absaugkühler. Bei koffeinarmen Kaffeesorten füllt man die Pipette aus dem Schüttelgefäß ein zweites und eventuell drittes Mal, entleert in das Kugelgefäß und dunstet ab. Zum Rückstand in der Kugel fügt man ein erbsengroßes Stück Paraffin, wenige ccm Äther, erwärmt schwach, setzt einige ccm einer 0,5%igen Salzsäure hinzu und schüttelt gut durch. Man verjagt den Äther unter Durchleiten eines Luftstromes im Wasserbade, kühlt die Kugel unter der Wasserleitung, wobei man durch leichtes Drehen die Paraffinfettschicht an den Wandungen haftend erhält, und gießt die Flüssigkeit durch das Wattefilter in den Schütteltrichter (Fig. IV). Der Rückstand in der Kugel wird mit einigen ccm 0,5%iger Salzsäure aufgeschmolzen und gut geschüttelt, dann wieder unter der Wasserleitung abgekühlt und die Flüssigkeit in den Schütteltrichter abgegossen. Diesen Vorgang wiederholt man im ganzen viermal. Dann schüttelt man die vereinigten Flüssigkeiten im Schütteltrichter viermal mit je einigen ccm Chloroform durch und läßt die Chloroformlösung durch das Wattefilter abfließen. Zwecks Reinigung des Rohkoffeins (nur bei koffeinarmen Kaffeesorten notwendig!) bringt man die Chloroformauszüge direkt vom Schütteltrichter in ein zweites Kugelgefäß, das genau wie in Fig. III beschaffen ist, doch bei b keinen Schliff, dafür aber eine vergrößerte und nach aufwärts gebogene Tulpe c besitzt. In diesem Kugelgefäß wird das Chloroform unter Luftdurchleiten im Wasserbad vertrieben; der Rückstand wird mit zirka 10 bis 20 ccm Wasser aufgenommen und bei Rohkaffee mit 1, bei gebranntem Kaffee mit 3 ccm einer 1%igen Kaliumpermanganatlösung versetzt und 15 Minuten in der Kälte stehengelassen. Zur Abscheidung des überschüssigen Mangans fügt man tropfenweise eine Wasserstoffsuperoxydlösung dazu, welche auf 100 ccm Wasser 3 ccm 30%iges Perhydrol und 1 ccm Eisessig enthält. Nun hängt man das Kugelgefäß etwa eine Viertelstunde in ein kochendes Wasserbad, gießt hierauf die Flüssigkeit durch das Wattefilter β

[2]) Österr. Chem.-Ztg. 1926, Nr. 6.

in den Scheidetrichter IV und wäscht mit einigen Portionen heißen Wassers nach. Dieser wässerige Koffeinauszug wird nun im Scheidetrichter mit Chloroform mehrmals ausgeschüttelt und die Chloroformauszüge im Destillierkölbchen des PREGL'schen KJELDAHL-Apparates gesammelt. — Wurde von der Reinigung des Rohkoffeins Abstand genommen, dann werden schon die ersten Chloroformausschüttelungen direkt aus dem Scheidetrichter in das Destillationskölbchen des KJELDAHL-Apparates gebracht. In beiden Fällen wird nach Zufügung eines kleinen, ausgeglühten Tonsplitters das Chloroform abgedunstet, das Rohkoffein mit 2 ccm konzentrierter Schwefelsäure und je einer Messerspitze Kaliumsulfat und Kupfersulfat versetzt, am Mikrobrenner in zirka einer halben Stunde aufgeschlossen und der KJELDAHL-Destillation unterworfen. Wenn man 30 ccm einer 0,02 n-H_2SO_4 vorlegt, kommt man auch für hohe Koffeingehalte aus. 1 ccm verbrauchter Säure entspricht bei Verwendung von einer Pipettenfüllung (= 1 g Kaffee) 0,0969% Koffein.

Analysenbelege:

Koffeinbestimmungen in gebranntem Kaffee.

Probe	Makrobestimmung			Größte Differenz	Mikrobestimmung			Größte Differenz	Mittel		Differenz der Mittel
									Makrobestimmung	Mikrobestimmung	
I	1,34	1,29	1,41	0,12	1,30	1,31	1,30	0,01	1,35	1,30	+ 0,05
II	1,52	1,41	1,47	0,11	1,42	1,41	1,41	0,01	1,47	1,41	+ 0,06
III	1,12	1,20	1,15	0,08	1,10	1,13	1,12	0,03	1,16	1,12	+ 0,04
IV	2,02	2,16	2,05	0,14	2,04	2,06	2,05	0,02	2,09	2,05	+ 0,04
V	1,38	1,37	1,29	0,09	1,35	1,33	1,35	0,02	1,34	1,35	— 0,01
VI	2,21	2,33	2,35	0,14	2,45	2,43	2,46	0,03	2,28	2,45	— 0,17
VII	1,1	—	—	—	1,41	1,39	1,41	0,02	1,1	1,4	— 0,3
VIII	1,0	—	—	—	1,14	1,13	—	0,01	1,0	1,1	— 0,1
IX	1,3	—	—	—	1,36	1,34	—	0,02	1,3	1,35	— 0,05
X	2,0	—	—	—	2,27	2,28	—	0,01	2,0	2,3	— 0,3
Gröste Differenz im Mittel				0,11	—	—	—	0,02	—	—	—
Größte Differenz der Methoden				—	—	—	—	—	—	—	— 0,3 + 0,06
Differenz der Methoden im Mittel				—	—	—	—	—	—	—	± 0,1

Koffeinbestimmungen in „koffeinfreiem“ Kaffee.

Probe	Makrobestimmung			Mittel	Mikrobestimmung			Mittel
I	0,068	0,056	0,070	0,065	0,053	0,056	0,055	0,055
II	0,049	0,065	0,057	0,054	0,045	0,042	0,048	0,045
III	0,068	0,075	0,081	0,075	0,066	0,059	0,061	0,062

Ein Apparat zur Mikrobestimmung der schwefeligen Säure in Luft.

Von **A. C. Röttinger.**

(Wien.)

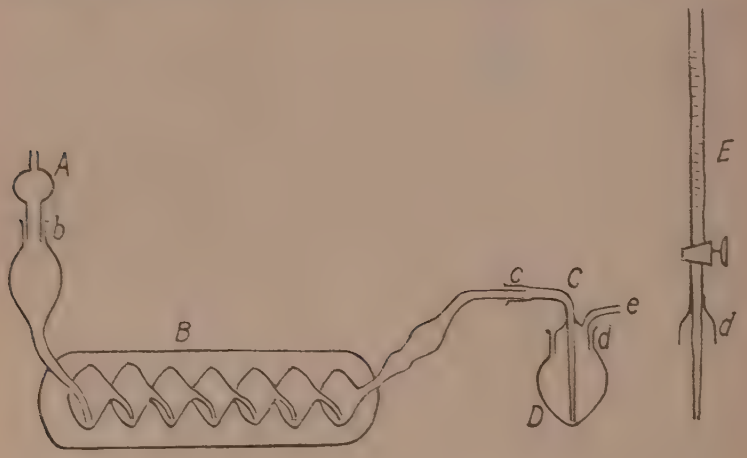
(Eingelangt am 16. Mai 1929.)

Bei der Beurteilung landwirtschaftlicher Rauchschäden spielt die Bestimmung der schwefeligen Säure in der Luft eine große Rolle. Die Bestimmung nach der bisher üblichen Art ist deshalb sehr umständlich, weil man 20 l Luft und mehr langsam durch einen Absorptionsapparat durchsaugen muß, was natürlich im Gelände nicht nur sehr langwierig, sondern auch mit vielen Fehlerquellen behaftet ist.

Es soll nun im folgenden eine Mikroapparatur beschrieben werden, die sich gut bewährt hat, und das Arbeiten mit nur 1 bis 2 l Luft gestattet, welche durch einen geeigneten Aspirator angesaugt werden.

Bei A besorgt ein Wattebausch die Filtration der eintretenden Luft, bei e wird angesaugt. Das Absorptionsgefäß B wird bei b mit 10 ccm einer 0,01n-Jodlösung beschickt und durch leichtes Ansaugen bei c wird diese Flüssigkeit in der ersten Hälfte der Kugeln verteilt; durch das spätere Durchleiten des Luftstromes wandert die Flüssigkeit in die weiteren Kugeln vor. Bei c wird das Einleitungsstück C angesetzt, das seinerseits das Kölbchen D trägt, welches mit 10 ccm 0,01n-Thiosulfatlösung gefüllt wird, um mitgerissenes Jod aufzufangen. Nach Beendigung des Luftdurchleitens wird unter Beseitigung und Abspülens des Stückes C der Inhalt von B nach D gebracht und nachgespült. Zum Nachspülen ist destilliertes Wasser zu verwenden, das man vorher mit 5 ccm 0,1n-Jodlösung mehrere Stunden stehengelassen und sodann nach Zusatz von Stärkelösung mit 0,1 — und zuletzt 0,01n-Thiosulfatlösung genau entfärbt hat. — Auf den Schliff d paßt die Mikrobürette E, die 5 ccm faßt und in 0,02 ccm geteilt ist; ihre Spitze reicht bis auf den Grund von D und ist so fein kapillar ausgezogen, daß bei einer mittelschnellen Umdrehung des Hahnes nur ein Bruchteil eines Teilstriches ausfließt. Mit Hilfe dieser Bürette wird der Inhalt von D nach Zugabe von Stärkelösung titriert.

Der Hauptvorteil des Absorptionsgefäßes B liegt darin, daß es bei guter Absorptionswirkung sich sehr leicht quantitativ auswaschen läßt.



Zum Nachweis von Thallium.

Von **A. J. Steenhauer.**

(Aus dem pharmazeutischen Institut der Universität Leiden.)

(Vorstand Prof. Dr. L. van Italie.)

(Eingelangt am 10. Juli 1929.)

Zur Identifizierung von Thallium benützt man die Umsetzung mit löslichen Chloriden, Jodiden und Platinichlorid. Von HAUSHOFER[1]) sind Reaktionen mit Oxalsäure und Kaliumchromat vorgeschlagen worden. Er erwähnt, daß das Thalliumoxalat ziemlich leicht löslich ist und deshalb in verdünnten Lösungen erst beim Verdunsten entsteht.

Die Angaben von HAUSHOFER über das Thallochromat bezeichnet BEHRENS-KLEY[2]) als unvollständig; diese Verbindung bildet ein hellgelbes Pulver, das sich in Nadeln und Spießen von Thallobichromat umwandelt.

Zur Ergänzung der vorstehend erwähnten Reaktionen wurde die Kristallisationsfähigkeit des Thalliums mit den nachstehenden Reagenzien überprüft.

1. Natriumthiosulfat: Eine Lösung von Thalliumazetat gibt mit Natriumthiosulfat farblose Würfel und kreuzförmige Rosetten, die dem Thallochlorid ähnlich sind; sie besitzen starke Lichtbrechung. Die Kristalle lösen sich in einem Überschuß von Natriumthiosulfat und können aus siedendem Wasser umkristallisiert werden. (Fig. 1.)

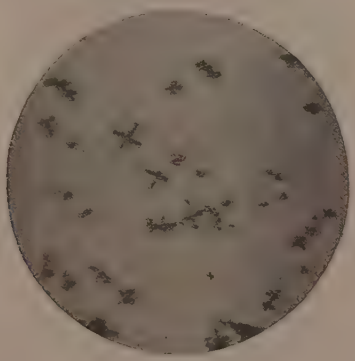


Fig. 1.

[1]) HAUSHOFER: Mikroskopische Reaktionen 1885, S. 127.

[2]) BEHRENS KLEY: Mikrochemische Analyse, 3. Auflage, I. Teil, S. 41.

2. Ammoniumbichromat: Aus salpetersauren Lösungen von Thalloverbindungen fallen auf Zusatz von Ammoniumbichromat sofort schöne gelbe, sternförmige Aggregate spießförmiger Kristalle aus. Die Reaktion ist sehr empfindlich. (Fig. 2.)

Fig. 2.

3. Ammoniummolybdat: Nach dem Zusatz von Ammoniak liefert Ammonmolybdat mit Thallosalzlösungen farblose sechsseitige Blättchen von Thallomolybdat. Sie sind sehr dünn und zeigen im auffallenden Licht schöne Interferenzfarben. (Fig. 3.)

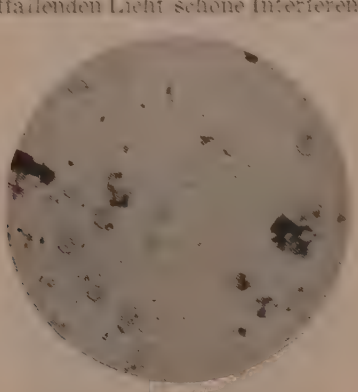


Fig. 3.

4. Ammoniumrhodanid: Ammonrhodanid fällt Nadeln und prismatische Kristalle, die ein starkes Lichtbrechungsvermögen besitzen. In verdünnten Lösungen von Thallosalzen bilden sich Sechsecke, die im auffallenden Licht Interferenzfarben zeigen. (Fig. 4.)

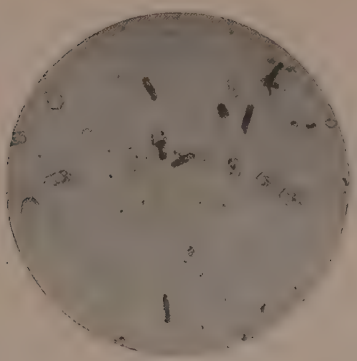


Fig. 4.

5. Mercurirhodanid: Versetzt man eine Lösung von Thalliumsalzen mit Mercurirhodanid, so entsteht sofort eine feinkristallinische Fällung. Sie verwandelt sich beim Stehen, viel schneller und schöner beim Reiben mit einem Platindraht in Prismen um, die meistens schiefe Endflächen besitzen. Sie zeigen sehr oft an den Enden der Kristalle ungleichseitige Dreiecke, die mit einer scharfen Spitze nach der Mitte der Kristalle hin verlaufen. Die Kristalle polarisieren stark mit gerader Auslöschung. (Fig. 5.)

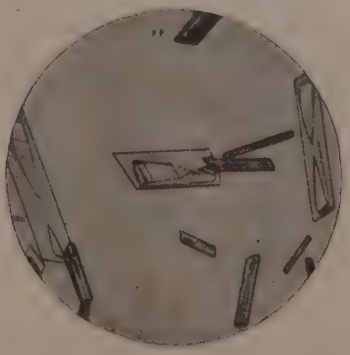


Fig. 5.

6. Weinsäure: Weinsäure (keine Tartrate) fällt aus Lösungen von Thallosalzen sehr schöne Prismen mit Domaflächen und vierseitige Prismen. Die Kristalle polarisieren lebhaft und zeigen gerade Auslöschung. Starke Säuren beeinträchtigen diese Reaktion. (Fig. 6.)

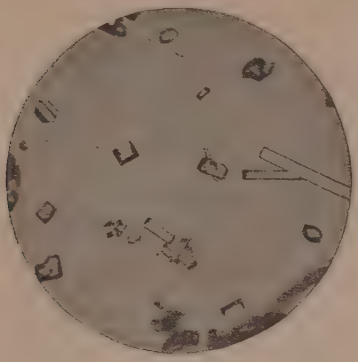


Fig. 6.

7. Pikrinsäure: Auf Zusatz von Pikrinsäure zu Thallosalzlösungen entstehen schöne gelbe Nadeln, Prismen und Kanten. Auch diese Reaktion wird von starken Säuren beeinträchtigt. (Fig. 7.)

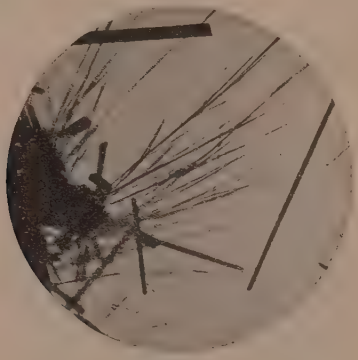


Fig. 7.

Wie schon HAUSHOFER erwähnt, liefert Oxalsäure in Lösungen von Thallosalzen farblose Tafeln von rhombischem Habitus. Man erhält Kristalle durch Zusatz eines Überschusses von Oxalsäure.

Von den vorstehend beschriebenen Reaktionen sind die mit Ammoniumrhodanid, Mercurirhodanid, Ammoniumbichromat und Weinsäure zum Nachweis von Thallosalzen besonders empfehlenswert.

Die Mikrobestimmung des Magnesiums mit o-Oxychinolin und seine Trennung vom Calcium.

Von **R. Strebinger** und **W. Reif.**

(Aus dem Institut für analyt. Chemie an der Technischen Hochschule in Wien.)

(Eingelangt am 8. Juli 1929.)

Die von R. Berg[1]) zum Zwecke einer Makrobestimmung des Magnesiums durch Fällung mit o-Oxychinolin beschriebene Magnesiumoxychinolin-Verbindung $Mg(C_9H_6ON)_2 . 2H_2O$, durch Trocknen bei 100 bis 105° erhalten, stellt vom mikroanalytischen Standpunkte eine geradezu ideale Wägungsform dar. Eignen sich doch für die quantitative Mikroanalyse besonders solche Verbindungen, bei denen das Verhältnis des Molekulargewichtes der Wägungsform zu dem des Atomgewichtes des zu ermittelnden Bestandteiles ein ziemlich großes ist — oder kurz gesagt, der „Faktor" klein ist. Schon F. Pregl[2]) erwähnt gelegentlich der mikroanalytischen Bestimmung des Phosphors den äußerst günstigen Umstand, daß in diesem Falle ein Niederschlag zur Wägung gebracht wird, der rund 69mal schwerer ist als das zu bestimmende Element, hingegen gelegentlich der Jodbestimmung weist F. Pregl[3]) darauf hin, daß hierbei Schwierigkeiten auftreten, da die geringsten Verunreinigungen, wie Staub usw., das Gewicht des Niederschlages vermehren, und, da über 50% des gewogenen Jodsilbers auf das zu bestimmende Jod entfallen, naturgemäß höhere Jodwerte resultieren. Wie der eine von uns (St) wiederholt ausgeführt hat[4]), eignen sich am besten solche Fällungsformen für mikroanalytische Zwecke, welche außerdem die Eigenschaft besitzen, keine andere Nachbehandlung als Trocknen bei bestimmter Temperatur erfordern, um brauchbare Wägungsformen zu liefern. Somit kommen in der anorganischen Mikroanalyse vielfach Verbindungen in Verwendung, welche durch Fällung mittels organischer Reagenzien erhalten werden, da diese in der Regel einen

[1]) R. Berg:: Zeitschr. f. analyt. Chemie. *71*, 23 (1927).

[2]) F. Pregl: Die quantitative organ. Mikroanalyse, II. Auflage, 154, Verlag J. Springer.

[3]) loc. cit.

[4]) G. Klein u. R. Strebinger: Fortschritte der Mikrochemie, Seite 6, Verlag F. Deuticke, Wien 1928.

großen Molekülkomplex darstellen und oft wegen ihrer Spezifität auch für Trennungen brauchbar sind. Wo man diesen zwei Grundforderungen — großer Molekülkomplex und einfaches Trocknen — entsprechen kann, wird man davon Gebrauch machen.

Allen diesen Anforderungen entspricht die von R. BERG beschriebene Magnesiumoxychinolin-Verbindung. Wir wählten als Wägungsform die wasserhaltige Verbindung, welche bei einer Trocknungstemperatur von 100 bis 105° erhalten wird, da das wasserfreie Magnesiumoxychinolat bei 140° schon teilweise Zersetzung erleidet und dadurch ungenaue Werte liefert.

Zum Sammeln der Niederschläge verwenden wir in unserem Institut die von F. PREGL[5]) ausgearbeitete Methode der automatischen Aufbringung des Niederschlages in ein „Halogenfilterröhrchen". Diese Methodik hat sich für die verschiedensten Niederschläge, wie der eine von uns (St) an zahlreichen Beispielen gezeigt hat[6]), außerordentlich bewährt und bietet auch in der Hand von weniger geübten Mikrochemikern die Gewähr guter Erfolge. Die Handhabung der PREGL'schen Filterröhrchen ist überaus einfach und läßt unsere langjährige Erfahrung im Anfängerpraktikum unseres Institutes den Schluß zu, daß diese Methodik das brauchbarste Filtrationsverfahren für die quantitative Mikroanalyse darstellt, welches derzeit bekannt ist, da schon die ersten quantitativen Mikrobestimmungen der Anfänger mit Hilfe des PREGL'schen Filterröhrchens tadellose Werte darstellen.

Wie später gezeigt wird, bietet die Mikrobestimmung des Magnesiums als Oxychinolat keinerlei Schwierigkeiten, hat jedoch einen großen Vorteil gegenüber der Makromethode; während in der Makroanalyse beim Trocknen bei 105° erst in zwei bis vier Stunden Gewichtskonstanz eintritt, ist dieser Punkt in der Mikroanalyse schon nach 20 Minuten sicher erreicht, da das Trocknen mit Hilfe des warmen Luftstromes im Filterröhrchen sehr rasch vor sich geht.

Zur Trennung des Calciums vom Magnesium hat sich nur die Methode der vorherigen Abscheidung des Calciums als Oxalat bewährt, wobei festgestellt wurde, daß diese Fällung aus nicht zu schwach essigsaurer Lösung vorgenommen werden muß, soll nicht teilweises Mitfällen des Magnesiums eintreten. Unsere Calcium-

[5]) loc. cit.

[6]) R. STREBINGER: Mikrochemie, *1* bis *5*, *7*.

werte waren anfangs alle, infolge der zu geringen Acidität, zu hoch und die Magnesiumwerte zu niedrig, erst durch Steigerung des Essigsäurezusatzes erhielten wir gute Werte. Das Calcium wurde als $CaC_2O_4 \cdot H_2O$ gewogen, einer Wägungsform, deren Brauchbarkeit erst kürzlich von einem von uns (St) wieder bestätigt wurde[7]).

Eine Beobachtung soll hier noch erwähnt werden. Bei extrem geringen Calciummengen (0,04 mg) neben viel Magnesium (5 mg) trat selbst nach mehrtätigem Stehen mit Ammonoxalat keine Fällung ein, auch unter dem Mikroskop ist keine Fällung wahrnehmbar.

Experimenteller Teil.

A. Die Bestimmung des Magnesiums.

In einer Fällungseprouvette wurde die in einer PREGL'schen Mikrobürette abgemessene Magnesiumchloridlösung mit einer Messerspitze festem Ammonchlorid und drei Tropfen Ammoniak konz. versetzt, im Wasserbadeinsatz auf 70° erwärmt und hierauf das Magnesium mit einer 1%igen alkoholischen Oxychinolinlösung im Überschuß (kenntlich an der beginnenden Gelbfärbung der überstehenden Flüssigkeit) gefällt. Nach 20 Minuten Absetzenlassen wurde in ein PREGL'sches Filterröhrchen übergesaugt, abwechselnd mit heißem, ammoniakhaltigem Wasser und Alkohol gewaschen, um auch die letzten Reste des Niederschlages auf die Asbestschicht zu bringen, schließlich mit Alkohol nachgespült und stark trockengesaugt. Nach dem Trocknen im PREGL'schen Trockenblock, und zwar zehn Minuten in der weiten und zehn Minuten in der engen Bohrung bei 105°, wird abkühlen gelassen und gewogen. Der Niederschlag enthält 6,98% Mg. Die gefundenen Werte sind in der Tabelle I verzeichnet.

B. Die Calcium-Magnesium-Trennung.

Aus zwei PREGL'schen Mikrobüretten wurde in eine Fällungseprouvette je eine abgemessene Menge einer Calciumchloridlösung und einer Magnesiumchloridlösung eingefüllt, mit zwei bis drei Tropfen Eisessig versetzt und auf 70° im Wasserbadeinsatz erwärmt. Hierauf zur Fällung des Calciums tropfenweise eine zur Hälfte mit Wasser verdünnte, kaltgesättigte Ammonoxalatlösung

[7]) R. STREBINGER: Mikrochemie, 7, 100 (1929).

zugefügt, noch fünf Minuten im Wasserbad belassen und dann eine Stunde in der Kälte absitzen gelassen. Nach dem Absaugen in ein PREGL'sches Filterröhrchen mit kaltem Wasser und Alkohol abwechselnd gewaschen, bei 105° getrocknet und als $CaC_2O_4 . H_2O$ gewogen. Das in einer Saugeprouvette[8]) gesammelte Filtrat wird mit einer Messerspitze Ammonchlorid versetzt, tropfenweise Ammoniak konzentriert bis zum deutlichen Überschuß zugegeben und, wie früher geschildert, mit o-Oxychinolin gefällt und weiterbehandelt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle II angeführt.

Tabelle I.

1 ccm $MgCl_2$-Lösung = 0.986 mg Mg.

ccm	$Mg(C_9H_6ON)_2 \cdot 2H_2O$	Mg gefunden	Mg berechnet	Δ mg
0,5	7,061 mg	0,493 mg	0,493 mg	± 0,0
0,4	5,577 mg	0,389 mg	0,394 mg	— 0,005
0,35	4,818 mg	0,344 mg	0,336 mg	— 0,008
0,3	4,310 mg	0,301 mg	0,296 mg	+ 0,005
0,2	2,894 mg	0,202 mg	0,198 mg	+ 0,004
0,1	1,560 mg	0,108 mg	0,099 mg	+ 0,009
0,1	1,328 mg	0,093 mg	0,099 mg	— 0,006

Die verwendete Magnesiumlösung wurde makrochemisch nach R. BERG bestimmt, durch Fällen von 50 und 100 ccm.

Tabelle II.

1 ccm $CaCl_2$-Lösung = 0·900 mg Ca.

	ccm	Auswage mg	Gefunden mg	Berechnet mg	Δ mg
Ca	1	3,276 $CaC_2O_4 \cdot H_2O$	0,899 Ca	0,900 Ca	— 0,001 Ca
Mg	0,5	7,092 $Mg(C_9H_6ON)_2 \cdot 2H_2O$	0,495 Mg	0,493 Mg	+ 0,002 Mg
Ca	0,5	1,654 $CaC_2O_4 \cdot H_2O$	0,454 Ca	0,450 Ca	+ 0,004 Ca
Mg	1	14,110 $Mg(C_9H_6ON)_2 \cdot 2H_2O$	0,985 Mg	0,986 Mg	— 0,001 Mg
Ca	0,25	0,838 $CaC_2O_4 \cdot H_2O$	0,230 Ca	0,225 Ca	+ 0,005 Ca
Mg	0,75	10,453 $Mg(C_9H_6ON)_2 \cdot 2H_2O$	0,730 Mg	0,739 Mg	— 0,009 Mg
Ca	0,75	2,450 $CaC_2O_4 \cdot H_2O$	0,672 Ca	0,675 Ca	— 0,003 Ca
Mg	1	14,243 $Mg(C_9H_6ON)_2 \cdot 2H_2O$	0,994 Mg	0,986 Mg	+ 0,008 Mg

Die verwendete Calciumlösung wurde makrochemisch nach C. WINKLER bestimmt, durch Fällen von 50, bezw. 100 ccm.

[8]) R. STREBINGER: Mikrochemie 7, 103 (1929).

Über eine quantitative Mikrobestimmung des Arsens in Leichenteilen.

Von **P. Szendrö** und **G. Fleischer.**

(Aus d. Inst. f. med. Chem. d. Tierärztl. Hochschule, Wien, Vorst. Prof. Dr. H. Jansch.)

(Eingelangt am 6. Juli 1929.)

Die lange Dauer der Arsenbestimmung im Leichenmaterial sowie die zeitraubende Arbeit, die, abgesehen von einem großen Aufwand an Chemikalien, nach der alten Methode notwendig ist, haben es wünschenswert erscheinen lassen, eine Methode ausfindig zu machen, die den Anforderungen sowohl in bezug auf Kürze der Zeit als auch an Genauigkeit der gefundenen Resultate entspricht.

Über Anregung des Herrn Prof. Dr. H. Jansch sollte versucht werden, unter den von verschiedenen Autoren angegebenen mikroanalytischen Bestimmungen des Arsens die zu dem erwähnten Zweck geeignetste aufzufinden.

Es sei nur erwähnt, daß nach der alten Untersuchungsweise die Zerstörung und Fällung einige Tage in Anspruch nimmt und erst nach dieser Zeit der qualitative Nachweis des Arsens erbracht werden kann, welcher Umstand besonders bei forensischen Untersuchungen als sehr unangenehm empfunden wird.

Der quantitative Nachweis erfordert wieder eine eintägige Wartezeit und somit ist das Resultat im besten Falle an eine etwa einwöchige Untersuchungsdauer gebunden.

Daß sich diese alte Methode so langwierig gestaltet, hat folgende Gründe:

1. Ist die Verarbeitung einer großen Menge organischen Materials notwendig.

2. Ist die Abtrennung des Arsens von den übrigen Metallen langdauernd und mit Schwierigkeiten verbunden, und

3. die Langwierigkeit der quantitativen Bestimmung des Arsens auf gravimetrischem Wege.

Diese Schwierigkeiten können umgangen werden:

1. Wenn es gelingt, in kleinen Mengen des Untersuchungsmaterials genügend genaue Resultate zu erhalten.

2. Wenn es möglich ist, eine Bestimmungsmethode für das Arsen zu finden, bei der keine zeitraubenden Trennungen vorgenommen werden müssen.

3. Durch Anwendung einer in kurzer Zeit ausführbaren Bestim-

mungsmethode für das Arsen, bei der vor allem die volumetrischen Bestimmungen in Betracht zu ziehen sind.

Die in letzter Zeit von verschiedenen Autoren angeführten mikroanalytischen Arsenbestimmungsmethoden, mit deren Hilfe es möglich ist, kleine Arsenmengen mit weitgehender Genauigkeit zu bestimmen, berechtigten zu der Hoffnung, auch mit geringsten Mengen Untersuchungsmaterial das Auslangen zu finden. Nur war es notwendig, durch möglichst feine Verteilung und innigstes Durchmischen des Materials eine so weitgehende Gleichmäßigkeit in der Verteilung zu erreichen, daß eine Menge von wenigen Grammen bereits als einwandfreie Durchschnittsprobe angesehen werden konnte.

Unter allen nach dieser Richtung hin arbeitenden Bestimmungsmethoden für das Arsen erschien uns die von O. WINTERSTEINER[1]) beschriebene als die für unsere Zwecke geeignetste, da sie außer der raschen Ausführbarkeit auch noch den Vorteil besitzt, das Arsen ohne vorhergehende Reduktion zu bestimmen (das heißt direkt in der Form, in der es nach Zerstörung der organischen Substanz vorliegt).

Außerdem steht sie keiner der anderen Bestimmungsmethoden an Genauigkeit nach. Eine Beeinträchtigung des Resultats ist für gewöhnlich höchstens durch Eisen oder Kupfer zu befürchten: es ist klar, daß bei Gegenwart von Antimon die Methode nicht anwendbar ist.

Die Anwesenheit von Kupfer müßte also vor Ausführung der Bestimmungsmethode nach WINTERSTEINER durch eine qualitative Untersuchung festgestellt werden und bei positivem Ausfall der Kupferreaktion wäre das Kupfer nach der bekannten und bewährten Mikromethode nach F. PREGL zu entfernen.

Mit der Gegenwart von Eisensalzen muß bei Aufarbeitung von Organmaterial selbstverständlich immer gerechnet werden. Um also auch bei Vorhandensein von Eisen richtige Werte für das Arsen zu erhalten, scheinen zwei Wege gangbar zu sein. Entweder könnte man eine vollständige Trennung des Arsens vom Eisen versuchen und die Bestimmung des Arsens in der eisenfreien Lösung ausführen, oder aber man könnte den Gesamtwert (also für Eisen und Arsen) bestimmen, den Gehalt an Eisen quantitativ ermitteln und um den entsprechenden Eisenwert von dem ersteren abziehen.

[1]) O. WINTERSTEINER, unter Mitwirkung von H. HANNEL, Mikrochemie IV, 155 (1926).

Vorversuche über eine Trennung des Arsens vom Eisen ließen bald erkennen, daß dieser Weg entweder eine Verlängerung der Arbeitszeit bedingt oder zu ungenauen Resultaten führt.

Dagegen bot die colorimetrische Bestimmung des Eisens Aussicht auf Erfolg.

Durch eine Reihe von Versuchen konnte festgestellt werden, daß die von BERMANN[2]) angegebene colorimetrische Bestimmung des Eisens als Rhodanid, auch bei Zerstörung der organischen Substanz mit dem NEUMANN'schen Säuregemisch in der von WINTERSTEINER angegebenen Modifikation, und zwar direkt in den wässerigen Lösungen (BERMANN setzt zu den zu colorimetrierenden Lösungen das gleiche Volumen Aceton zu) einwandfreie Resultate liefert.

Die beigeschlossene Tabelle zeigt, daß die durch Verbindung dieser beiden Methoden (colorimetrische Bestimmung des Eisens; maßanalytische Bestimmung von Eisen und Arsen nach WINTERSTEINER) unternommenen Versuche bis herab zu einer Menge von 0,1 bis 0,05 mg Arsen in 1 g Organen durchaus befriedigende Werte liefern.

Die Bestimmungen wurden im wesentlichen nach den von WINTERSTEINER gemachten Angaben durchgeführt und nur insoweit kleine Änderungen berücksichtigt, als sie für die Untersuchung des organischen Materials und die Genauigkeit der Versuche nach dieser Richtung hin notwendig waren.

Ausführung der Bestimmung*):

2 g Organe werden in einen Zerstörungskolben eingewogen, einige ccm Schwefelsäure von 33 Volum-Prozent zugesetzt, wodurch etwa an der Wand haftende Organteilchen in die Kugel des Kolbens hinabgespült werden. Dann werden zirka 1 ccm konzentrierte Salpetersäure und schließlich eine bestimmte Menge Arsen zugesetzt. Das Eindampfen erfolgt nun am schnellsten aus freier Hand über der Flamme eines klein gedrehten Bunsenbrenners, bis weiße Schwaden von Schwefeltrioxyd zum Vorschein kommen. Der Vorgang muß unter oftmaligem Zusatz von konzentrierter Salpetersäure solange fortgesetzt werden, bis auch die letzten Spuren organischer Substanz zerstört sind. Als beendet ist der Vorgang erst

[2]) BERMANN, Journ. biol. Chem., Bd. 35, S. 231 (1918).

*) Anmerkung: Soweit sich die Beschreibung auf die Zerstörung organischen Materials und auf die Ausführung der Titration bezieht, haben wir uns zum Teil des Wortlautes von O. WINTERSTEINER bedient.

dann anzusehen, wenn die Flüssigkeit vollkommen klar und hell gefärbt ist, was durch mehrmaligen Zusatz von konzentrierter Salpetersäure in den meisten Fällen erreicht werden kann. In jenen Fällen, wo eine einwandfreie helle und klare Farbe durch konzentrierte Salpetersäure nicht zu erzielen ist, geht man sicher, wenn unter Zusatz von einigen Tropfen Perhydrol nochmals bis zum Aufsteigen von Schwefeltrioxyddämpfen erhitzt wird. Bei schwer verbrennlichen Substanzen, welche durch einmaliges Zusetzen von Perhydrol noch keine wasserklare Lösung liefern, wird die Behandlung mit Perhydrol solange fortgesetzt, bis die Flüssigkeit vollkommen klar erscheint. Der Inhalt des Kolbens wird nun abkühlen gelassen, sodann mit ungefähr 1 ccm Wasser versetzt und bis zum Auftreten der Schwefeltrioxyddämpfe eingedampft. Dieser Vorgang wird am besten noch einmal wiederholt zum Zwecke der vollständigen Zersetzung der Sulfomonopersäure und Nitrosylschwefelsäure. Das Abdampfen des Wassers geschieht am schnellsten und sichersten aus freier Hand über der Flamme und nimmt kaum einige Minuten in Anspruch. Der ganze Vorgang einschließlich der Titration und Colorimetrie dauert höchstens eine bis eineinhalb Stunden.

Zum Kolbeninhalt wird nun noch zirka 1 ccm Wasser zugesetzt, zur Entfernung der Luft noch einmal aufgekocht, in ein 10 ccm fassendes Meßkölbchen ausgegossen und bis zur Marke mit destilliertem Wasser gefüllt. Der Inhalt des Kölbchens wird nach kräftiger Durchmischung mit dem Wasser in ein 150 ccm fassendes Gefäß mit eingeschliffenem Glasstöpsel ausgegossen, 5 ccm werden für die Colorimetrie entnommen und die restlichen 5 ccm nach mehrmaligem Ausspülen des Meßkölbchens mit 10 ccm konzentrierter reiner Salzsäure zur Titration verwendet. (Die Salzsäure wird vorher durch ungefähr zwei Minuten auf dem Drahtnetz über einer klein gedrehten Bunsenflamme ausgekocht, um den Sauerstoff und freies Chlor zu entfernen.)

Zu der für die Titration zur Verwendung kommenden Lösung werden 2 ccm einer 4%igen Lösung von reinem, jodatfreiem Kaliumjodid zugefügt, das Gefäß verschlossen und zehn Minuten stehengelassen. Die Titration des ausgeschiedenen Jods erfolgt mit 0.01 n-Thiosulfatlösung aus einer BANG'schen, 10 ccm fassenden Mikrobürette (zur genauen Ablesung wurde im späteren Verlauf der Untersuchungen eine 2 ccm fassende Mikrobürette mit Hundertstelteilung verwendet). Ist das Jod soweit durch das Thio-

sulfat entfernt, daß die Lösung nur mehr schwach gelb gefärbt erscheint, so wird soviel Wasser zugesetzt, daß das Volumen ungefähr 20 ccm beträgt, und drei Tropfen einer 1%igen Stärkelösung zugefügt. Als Endpunkt der Titration wird das Auftreten eines charakteristischen, schwach rötlichen Farbtones angesehen. Eine schwache Nachbläuung wird beim Einhalten der Angaben erst nach ungefähr zehn Minuten zu beobachten sein. Zur Erreichung einwandfreier Ergebnisse ist es notwendig, eine Blindprobe mit der zur Verwendung gelangenden Kaliumjodidlösung auszuführen. Nach unseren Erfahrungen treten schon nach zwei- bis dreistündigem Stehen der Kaliumjodidlösung so starke Jodausscheidungen auf, daß sie nicht mehr vernachlässigt werden dürfen und auch bei ganz frisch bereiteten Lösungen wurden nach dem zehn Minuten langen Stehen mit der starken Salzsäure meistens geringe Mengen der $\frac{n}{100}$-$Na_2S_2O_3$-Lösung (0.1 bis 0.2 ccm) verbraucht.

Aus der beigefügten Tabelle ist ersichtlich, daß die bei der Untersuchung „konstruierter" Fälle (Zusatz einer genau bekannten Menge arsensauren Natriums zu einer abgewogenen Menge tierischer Organe) durchaus befriedigende Resultate erhalten wurden. Es wurde in der Weise eine Annäherung an einen Ernstfall versucht, daß größere Mengen (365 g) Organe mit einer Arsenlösung von bestimmter Konzentration versetzt wurden. Hiervon wurden nach inniger Durchmischung dreimal je 2 g entnommen und das Arsen in der angeführten Weise bestimmt. Die Titrationswerte blieben sich mit unbedeutenden Schwankungen im wesentlichen gleich. (Nr. 13, 14, 15 der Tabelle.)

Um ganz sicher zu gehen und den natürlichen Verhältnissen in jeder Weise zu entsprechen, wurde die Brauchbarkeit des beschriebenen Untersuchungsverfahrens auch für gerichtlich-chemische Ernstfälle durch Vergiftung eines Hundes (kurzhaariger Dackel von ungefähr 10 kg Körpergewicht) geprüft. Zur Bestimmung wurden die sämtlichen inneren Organe verwendet. Die Untersuchungen wurden vergleichsweise nach dem bei uns üblichen Makroverfahren quantitativ auf Arsen vorgenommen. Die gesamten Organe (Magen, Darm, Herz, Lunge, Leber, Nieren) im Gewichte von 2045 g wurden mit der Faschiermaschine möglichst fein zerschnitten und dann wurde durch langes gründliches Durchmischen eine gleichmäßige Verteilung des enthaltenen Arsens erzielt.

200 g dieser gut durchgemischten Menge wurden mit HCl und $KClO_3$ zerstört und das Arsen durch Fällen mit H_2S, Lösen in

$(NH_4)_2S$. Oxydieren mit HNO_3, Schmelzen mit Soda-Salpeter, Ansäuern, Fällen mit Mg-Mixtur bestimmt. Die Menge des Mg-Pyroarsenats betrug in je der Hälfte der Lösung 0,0170, bezw. 0,0159 g, dies entspricht einem Gehalt von 10,83, bezw. 10,13 mg Arsentrioxyd in je 100 g der Organe.

In je 2 g der Organe wurde unter Anwendung der Arsenbestimmung nach WINTERSTEINER und der colorimetrischen Bestimmung des Eisens ein Gehalt von 0,091, 0,096, 0,115 mg As_2O_3 für je 1 g Organe festgestellt. Dies entspricht einem Gehalt von 10,1 mg As_2O_3 auf je 100 g der Organe. (Durchschnittswert der drei ausgeführten Bestimmungen.) (Nr. 16, 17, 18 der Tabelle.)

Diese Bestimmungen zeigen demnach genügend weitgehende Übereinstimmung, um die Anwendung dieses neuen Verfahrens auch für gerichtlich-chemische Untersuchungen berechtigt und empfehlenswert erscheinen zu lassen.

Zum Schluß erlauben wir uns, Herrn Professor Dr. H. JANSCH für die gegebenen Anregungen unseren wärmsten Dank auszusprechen.

	Gesamtverbrauch an Thiosulfat $\frac{n^*)}{100}$ ccm Lösung	Blindwert $\frac{n^*)}{100}$ ccm Thiosulfat Lösung	Dem Eisen entsprechende Menge Thiosulfat $\frac{n^*)}{100}$ ccm Lösung	Dem Arsen entsprechende Menge $\frac{n^*)}{100}$ ccm Lösung Thiosulfat	Zugesetzte Menge Arsen als mg As_2O_3	Gefundene Menge Arsen als mg As_2O_3
1.	3,75	0,15	0,56	3,04	1,505	1,462
2.	2,70	0,20	0,93	1,57	0,753	0,765
3.	1,80	0,15	0,87	0,78	0,375	0,375
4.	1,70	0,20	0,58	0,39	0,149	0,187
5.	0,95	0,20	0,41	0,34	0,149	0,164
6.	0,85	0,15	0,52	0,18	0,075	0,087
7.	1,84	0,20	1,27	0,37	0,154	0,178
8.	1,54	0,20	0,99	0,35	0,154	0,168
9.	0,96	0,20	0,56	0,20	0,077	0,096
10.	0,88	0,00	0,70	0,18	0,077	0,087
11.	1,04	0,20	0,70	0,14	0,039	0,067
12.	1,00	0,20	0,67	0,13	0,039	0,062
13.	1,12	0,20	0,54	0,38	0,164	0,183
14.	1,60	0,20	1,03	0,37	0,164	0,178
15.	1,58	0,20	0,98	0,40	0,164	0,192
16.	0,71	0,22	0,30	0,19		0,191
17.	0,96	0,20	0,56	0,20		0,096
18.	0,82	0,22	0,36	0,24		0,115

*) Normalitätsfaktor = 0,9719.

Über die Brauchbarkeit der isomeren Aminonaphtholsulfosäuren für die kolorimetrische Phosphorbestimmung.

Von **Béla Vásárhelyi** (Debrecen).

(Aus dem Institut für angewandte medizinische Chemie der Universität Wien.)

(Eingelangt am 8. Juli 1929.)

Die kolorimetrischen Phosphorbestimmungen verwenden mit wenigen Ausnahmen die Reduktion der komplexen Phosphormolybdänsäure zu blau gefärbten Molybdänoxyden. Als Reduktionsmittel kommen, neben dem von DENIGÈS eingeführten Stannochlorid, in erster Linie organische Reduktionsmittel in Frage, die jedoch die Bedingung erfüllen müssen, mit überschüssiger Molybdänsäure nicht zu reagieren*). Den ersten brauchbaren Versuch in dieser Richtung bedeutete die Einführung des Hydrochinons durch BELL-DOISY[1]). Die Verwendung des Hydrochinons hat freilich eine Reihe von Nachteilen. Hier sind in erster Linie die langsame Entwicklung der Blaufärbung und eine gewisse Farbschwäche zu nennen, ferner die enorme Empfindlichkeit der Reaktion gegen schon geringe Schwankungen in der Azidität. Dazu kommt, daß die Anwesenheit einer Reihe von Substanzen die Reaktion störend beeinflussen. So in erster Linie Oxalat, ferner ein etwas größerer Gehalt an Chlorid und Sulfat, weiters schon geringe Mengen Nitrit, Eisen und Kieselsäure, alles Substanzen, deren Gegenwart im biologischen Material nicht immer auszuschließen ist. Diese Nachteile veranlaßten FISKE und SUBBAROW[2]), eine Reihe von anderen Substanzen auf ihre Brauchbarkeit für die kolorimetrische Phosphorbestimmung zu untersuchen, und zwar wurde von ihnen neben dem Hydrochinon das Monochlorhydrochinon, das 2,5-Dichlorhydrochinon mit wenig ermutigendem Erfolg geprüft. Auch die Aminophenole, wie das 2-Chlor-4-Aminophenol, 2,4-Diaminophenol, p-Methylaminophenol, 2-Chlor-4-Aminophenol, sowie das 5-Aminosaligenin ergaben keine wesentlichen Vorteile gegenüber dem Hydrochinon. Dagegen

*) Bezüglich der theoretischen Grundlagen dieser elektiven Reduktion des Phosphormolybdänkomplexes vergleiche die Arbeiten von FEIGL (Zeitschr. f. anal. Chem. *64* und *74*). Über die Konstitution der blauen Molybdänoxyde siehe die Untersuchungen von HSEIN WU (Journ. of biol. Chem. *43*, 189, 1920).

[1]) BELL-DOISY: Journ. of biol. Chem. 44, 55, 1920.

[2]) FISKE-SUBBAROW: ibid., 66, 375, 1925.

konnten in zwei isomeren Aminonaphtholsulfosäuren, und zwar in der 1,2,6- und 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure, zwei Substanzen aufgefunden werden, welche die Nachteile des Hydrochinons vermissen ließen und neben einer wesentlich rascheren Entwicklung auch zu einer intensiveren Färbung führen. Mit Rücksicht auf die leichtere Zugänglichkeit entschlossen sich FISKE und SUBBAROW zur methodischen Einführung der 1,2,4-Säure, die sowohl nach den Vorschriften von FOLIN[3]) präparativ leicht zugänglich ist und auch als technisches Präparat im Handel erhältlich ist. Wenn man die Liste der bisher zur Untersuchung gelangten organischen Substanzen überblickt, so zeigt sich, daß sämtliche, einschließlich des von TSCHOPP[4]) vorgeschlagenen Rodinals (p-Aminophenol), Entwicklercharakter zeigen und dadurch ausgezeichnet sind, daß sie oxydativ leicht in Chinone übergehen können. Dabei scheint, wie aus den Untersuchungen von FISKE und SUBBAROW an den chlorsubstituierten Hydrochinonen hervorgeht, die Substitution im Benzolkern unter Umständen die Reaktion ungünstig zu beeinflussen.

Bestehen nun wirklich Beziehungen zwischen Konstitution dieser der Chinonbildung fähigen Reduktionsmittel und ihrer Einwirkung auf den Phosphormolybdänkomplex? Zur vorläufigen Entscheidung dieser Frage wurden auf Veranlassung von Professor H. K. BARRENSCHEEN zunächst eine Reihe isomerer Aminonaphtholsulfosäuren und Aminonaphtholdisulfosäuren untersucht. Theoretisch konnte hier sowohl die Stellung der NH_2- zur OH-Gruppe als auch die Stellung der SO_3H-Gruppe zur NH_2-Gruppe von Bedeutung sein. Die Untersuchungen wurden an folgenden Aminonaphtholsulfosäuren durchgeführt:

1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure
1,8,4- „
2,3,6- „
2,8,6- „ (G-Säure).

Von Aminonaphtholdisulfosäuren kamen die

1,8,2,4-Aminonaphtholdisulfosäure
1,8,3,6- „
1,8,4,6- „ (K-Säure)
2,8,3,6- „

[3]) FOLIN: ibid. 51, 377, 1922.
[4]) TSCHOPP: Biochem. Zeitschr. 203, 267, 1928.

zur Untersuchung. Die theoretischen Möglichkeiten zur Chinonbildung sind bei den geprüften Substanzen recht mannigfaltig. Neben der Entstehung von Naphthochinonimiden ist die Möglichkeit von Ortho-, Para- und Amphinaphthochinonen vorhanden. Ebenso wäre eine Bildung von Dinaphthyldichinonen in Erwägung zu ziehen. Welche der gegebenen Möglichkeiten sich im Einzelfalle realisiert, läßt sich nicht sagen. Diesbezügliche Untersuchungen konnten in der Literatur nicht aufgefunden werden.

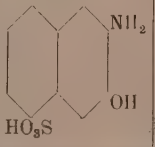
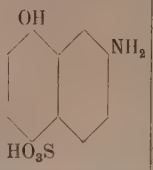
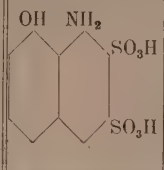
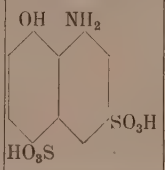
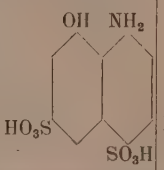
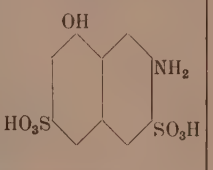
Sämtliche Säuren, welche als technische Präparate vorlagen, wurden entweder, wie die wasserlöslichen Disulfosäuren, durch Umkristallisieren aus Wasser oder, nach dem Vorgang von FISKE und SUBBAROW, aus ihrer Lösung in Bisulfit-Sulfit durch Umfällen mit Salzsäure gereinigt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet. Für die Prüfung auf ihr Verhalten gegen den Phosphormolybdänkomplex kamen sie in einer der FISKE-SUBBAROW'schen Lösung der 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure entsprechenden Form — 0,25%ige Lösung in Bisulfit-Sulfit — zur Anwendung. Die Lösungen der 1,8,2,4- und 1,8,3,6-Disulfosäure zeigten eine etwas stärkere gelbliche Eigenfarbe, die übrigen wichen in ihrem Aussehen nicht wesentlich von der 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure ab.

Keine der in Verwendung kommenden Säuren zeigte auch bei einstündiger Einwirkung sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei 37° eine Reduktionswirkung auf Molybdänsäure, dagegen ergaben sämtliche unter den Bedingungen der Phosphorbestimmung nach FISKE-SUBBAROW eine mehr weniger ausgesprochene Reduktion des Phosphormolybdänkomplexes zu blauen Molybdänoxyden. Die erhaltene Blaufärbung ist bei sämtlichen proportional der vorhandenen Phosphorsäure. Unter Zugrundelegung der mit der 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure erhaltenen Färbung ergaben sich folgende in Tabelle 1 zusammengestellte Ergebnisse:

Wie aus der Tabelle hervorgeht, zeigen sich gegenüber der 1,2,4-Säure wesentliche Unterschiede. Am auffälligsten ist zunächst der langsame Eintritt der Farbentwicklung, am stärksten ausgesprochen bei der 1,8,4-Säure und der 2,8,3,6-Disulfosäure, bei welchen vergleichbare Farbtöne erst nach 25 bis 40 Minuten erhalten wurden. Ein weiterer Unterschied ergibt sich darin, daß das Maximum der Färbung relativ spät, fast durchgehends erst nach einer Stunde, erreicht wird, dann aber, wie weitere, in die Tabelle nicht aufgenommene Kontrolluntersuchungen über drei Stunden hinaus ergaben, konstant bleibt. Einige der untersuchten Säuren

Tabelle I.

Standardlösung (1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure) 0·4 mg. P. Standardeinstellung: 20 mm.
Ablesung in mm. Temperatur: 37° C.

Zeit der Ablesung in Minuten	Aminonaphtholsulfosäure 1.8.4	Aminonaphtholsulfosäure 2.3.6 	Aminonaphtholsulfosäure 2,8,6 	Aminonaphtholsulfosäure 1,8,2,4 	Aminonaphtholsulfosäure 1,8,3,6 	Aminonaphtholsulfosäure 1,8,4,6 	Aminonaphtholsulfosäure 2,8,3,6 
5	.	.	.	.	.	.	.
10	.	.	21,1	.	.	24,2	.
15	.	22,9	19,8	.	23,5	.	.
20	.	20,0	19,5	24,3	22,3	22,0	.
25	.	.	.	20,2	20,0	.	.
30	21,2	19,2	19,2	18,4	18,7	19,9	.
40	.	18,2	.	16,0	18,6	.	24,2
50	19,9	.	19,2	.	.	19,7	22,6
60	16,1	17,7	19,1	15,9	18,6	19,6	22,1

zeigen einen wesentlich günstigeren Effekt wie die 1, 2, 4-Säure. Doch steht diesem Vorteil der Nachteil der langsameren Farbentwicklung entgegen.

Läßt sich nun die Wirkungsweise der untersuchten Säuren mit ihrer Konstitution irgendwie in Zusammenhang bringen? Es zeigt sich, daß offenbar den günstigsten Effekt jene Säuren zeigen, bei denen die NH_2- und OH-Gruppe in Orthostellung zueinander stehen. Es gilt das für die von FISKE-SUBBAROW untersuchte 1,2,4- und 1,2,6-Säure, welche annähernd gleiche Wirksamkeit entfalten, ebenso wie für die hier untersuchte 2,3,6-Säure. Wesentlich ungünstiger liegen die Verhältnisse bei Stellung der NH_2- zur OH-Gruppe in 1,8-Stellung. Die 2,8-Stellung läßt wieder eine relativ geringe Verzögerung erkennen, zeigt jedoch nicht diese maximale Farbentwicklung wie die übrigen untersuchten Säuren. Neben der gegenseitigen Stellung der NH_2- und OH-Gruppen scheint auch die Stellung der Sulfogruppe zur Aminogruppe von ausschlaggebender Bedeutung zu sein. Es ist dies am deutlichsten bei den isomeren Disulfosäuren ersichtlich. Im allgemeinen läßt sich sagen, daß der Sulforest in Orthostellung zur Aminogruppe hemmend wirkt. Es ist naheliegend, daran zu denken, daß die Festlegung der NH_2-Gruppe durch innere Salzbildung hiefür verantwortlich ist. Je größer die Entfernung des Sulforestes von der Aminogruppe, um so geringer die Verzögerung (siehe das Verhalten der 1,8,3,6- und 1,8,4,6-Disulfosäure). Dieser hemmende Einfluß der Stellung der SO_3H-Gruppe zeigt sich am klarsten beim Vergleich der 2,8,6-Säure mit der 2,8,3,6-Disulfosäure, welche von allen untersuchten die stärkste Verzögerung und den geringsten Endeffekt ergibt. Hinsichtlich der Brauchbarkeit für kolorimetrische Zwecke kommen wohl nur die 2,3,6- und 2,8,6-Säure in Frage, die am raschesten zu einer konstanten Färbung führen.

In einer weiteren Reihe von Untersuchungen wurde der Einfluß verschiedener Säurekonzentrationen sowie der Gegenwart solcher Stoffe untersucht, die bei biologischem Material vielfach vorkommen können. In erster Linie NaCl, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_2$, Fe-Salze, Kieselsäure und Oxalat. Die Untersuchungen wurden sowohl bei Entwicklung der Färbung bei Zimmertemperatur als auch bei Einwirkung von 37°, wie sie von JENDRASSIK und LOHMANN[5]) vorgeschlagen wurde, durchgeführt. Für die 1,2,4-Säure sind

[5]) JENDRASSIK und LOHMANN: ibid. 178, 419, 1926.

Tabelle II.

Standardlösung: 0,4 mg P.
Standardeinstellung: 20 mm.
Volumen: 100 cm³

H_2SO_4 Conc.		0,5 N									0,6 N	0,3 N	
Zusatz		M.-NaCl	0,4 M $NaNO_3$	KNO_2		$(NH_4)_2SO_4$		$FeCl_3$%			K_2SiO_3		20cm³ 20%ige CCl_3COOH + Kalium-oxalat%	
				0,005 M	0,02 M	0,25 M	0,5 M	2 mg Fe	8 mg Fe	15mg Fe	Si:P-50	Si:P-200	30mg	60mg
Temp.	Zeit in ′	1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure												
C 37°	5	20,1	20,0	20,0	20,2	20,0	20,1	20,1	20,0	20,1	19,8	17,7	20.0	20.0
	10	·	·	·	·	·	·	·	·	·	17,0	10,2	20,0	20,0
	15	20,0	20,2	20,2	20,2	20,1	20,0	20,0	20,1	20,2	·	·	·	·
	20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	15,1	8,4	19.9	20.0
	30	20.0	20.7	20.8	20.3	20,3	21.0	20,1	20,2	20.5	13,4	7,7	20,0	19,9
	60	20.0	22.5	20.7	20.6	20.6	21.0	20,1	20.4	20,6	·	·	·	·
C 21°	2	20.1	20.0	20.2	20,3	20,5	20.6	20,2	20.3	20.6	20.0	19.8	20.0	20.2
	6	20.0	20.0	20.0	20,1	20,1	20,3	20,0	20.2	20.4	20.0	19.7	20 0	20.2
	15	20.0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,1	20,1	19,8	19,6	20.0	20.0
		1,8,4-Aminonaphtholsulfosäure												
C 37°	10	grün	23.1	grün	grün	grün	grün	23,4	grün	grün	20,0	·	17,9	·
	20	,,	22.0	,,	,,	28,1	,,	22.1	,,	,,	19,6	·	18 1	·
	40	24.2	20 8	23,2	21,7	22 1	28.6	20 0	19.3	19.9	15,1	·	18,0	·
	60	23.1	20,9	21,4	21.2	21,8	23,8	20,1	19,5	19,3	10,7	·	·	·
C 22°	20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,8	·	20,6	·
	30	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,9	·	21,2	·
	60	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,9	·	21,3	·
		2,3,6-Aminonaphtholsulfosäure												
C 37°	10	22.4	20.1	grün	grün	25,7	grün	20.1	grün	grün	20.0	16,9	20.0	·
	20	22.1	20.0	,,	,,	24.4	,,	20,0	,,	,,	18.1	14.2	19,8	·
	40	19.9	20,1	23.5	24.8	21.3	23.2	19.9	21.1	,,	11.5	9.2	19.4	·
	60	20.0	20,1	21.2	23.2	21.3	23.2	20.0	19.2	22.2	8.6	7.2	19.3	·
C 22°	20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	20,1	·	20,1	·
	30	·	·	·	·	·	·	·	·	·	20,1	·	20,1	·
	40	·	·	·	·	·	·	·	·	·	20.0	·	20.0	·
	60	·	·	·	·	·	·	·	·	·	20.0	·	20.0	·
		2,8,6-Aminonaphtholsulfosäure												
C 37°	10	20.0	20.0	grün	grün	20.0	24,1	grün	grün	·	19,4	·	20.0	·
	20	20.0	20.0	,,	,,	20.8	23,4	,,	,,	·	16.5	·	20.1	·
	40	20 0	21,2	,,	,,	21,5	22.2	,,	,,	·	13.4	·	20.1	·
	60	21.2	23.2	,,	,,	22.6	22.8	,,	,,	·	9.9	·	20.0	·
C 22°	10	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19.9	·	20 0	·
	20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,8	·	20.0	·
	40	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,8	·	20.0	·
	60	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,7	·	20,0	·

Tabelle II.

Standardlösung: 0,4 mg P.
Standardeinstellung: 20 mm.

Volumen: 100 cm³

H_2SO_4 Conc.		0,5 N									0,6 N		0,3 N	
Zusatz		M.-NaCl	0,4 M $NaNO_3$	KNO_2		$(NH_4)_2SO_4$		$FeCl_3$			K_2SiO_3		20 cm³ 20%ige CCl_3COOH + Kalium-oxalat	
				0,005 M	0,02 M	0,25 M	0,5 M	2 mg Fe	8 mg Fe	15mg Fe	Si:P 50	Si:P 200	30mg	60mg
Temp.	Zeit in ′	1,8,2,4-Aminonaphtholdisulfosäure												
C 37°	10	grün	20,1	braun	braun	grün	grün	12,7	grün	·	grün	·	24,2	·
	20	„	20,1	„	„	29,1	„	13,6	„	·	„	·	24.2	·
	40	22.1	20,1	„	„	22,0	„	20,3	20.1	·	20.1	·	24.0	·
	60	21,4	21.0	„	„	21,1	24,1	20,2	20,2	·	20.2	·	24.0	·
C 22°	20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	20.0	·	23,4	·
	40	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19.8	·	23,7	·
	60	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19.6	·	24,3	·
		1,8,3,6-Aminonaphtholdisulfosäure												
C 37°	10	grün	21.2	grün	grün	21,4	grün	22.8	grün	·	19.3	·	24.2	·
	20	„	22,2	„	„	21,6	„	22,4	„	·	17,5	·	20,3	·
	40	24,5	22,2	„	„	21,5	„	20,0	„	·	17,0	·	20,1	·
	60	22.9	23.4	23,2	23.2	21,6	26.6	19.6	17.4	·	13.4	·	20.0	·
C 22°	20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19.4	·	24,3	·
	40	·	·	·	·	·	·	·	·	·	18,6	·	21,9	·
	60	·	·	·	·	·	·	·	·	·	18,5	·	21,2	·
		1,8,4,6-Aminonaphtholdisulfosäure												
C 37°	10	20.0	20.1	22.3	20.0	20.0	19.8	19.9	grün	·	18.9	·	22.5	·
	20	20,0	20,1	22,4	20,0	20,0	19,8	20,1	25,3	·	16,0	·	22,4	·
	40	20.0	21.6	22.4	21.8	20.0	20.0	20.1	20.1	·	14.5	·	22.2	·
	60	20,1	22,1	22,3	22,2	20,0	20,2	20,0	20,1	·	11,6	·	20.5	·
C 22°	10	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,9	·	27,1	·
	20	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,8	·	25,7	·
	40	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19,8	·	25,1	·
	60	·	·	·	·	·	·	·	·	·	19.8	·	25,0	·
		2,8,3,6-Aminonaphtholdisulfosäure												
C 37°	10	23,8	20,1	18,7	15,2	22,2	25,0	gelb	gelb	·	20,1	·	20,1	·
	20	20.1	20,1	18,6	15,2	20,2	23,1	„	„	·	17.2	·	20.0	·
	40	20.1	20.1	18.6	15.4	20.2	23.1	„	„	·	15.6	·	20.0	·
	60	20.0	20.1	19.2	gelb	20.2	22.7	„	„	·	14.7	·	20.0	·
C 22°	10	27.5	20.2	18.2	10.3	23.3	32.3	gelb	gelb	·	20.1	·	20.3	·
	15	27.3	20,2	19.1	14.2	23.2	32.1	„	„	·	20.1	·	21,6	·

derartige Versuche bei Zimmertemperatur von FISKE-SUBBAROW bereits veröffentlicht worden mit dem Ergebnis, daß die Reaktion weitgehend von der Azidität unabhängig ist und auch durch relativ hohe Konzentrationen der angeführten Stoffe nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Eine Nachprüfung dieser Angaben zeigte ihre vollkommene Richtigkeit, ergab jedoch, daß bei Entwicklung der Farbe bei 37° nach JENDRASSIK und LOHMANN ein größerer Gehalt von Kieselsäure sich störend geltend macht und wesentlich zu hohe Werte ergibt. Ungünstiger liegen die Verhältnisse bei den isomeren Sulfo- und Disulfosäuren, welche durch höhere Konzentrationen von fast sämtlichen der angeführten Stoffe deutlich gestört werden. Diese Störung kann in manchen Fällen eine Ablesung unmöglich machen. Der Raumersparnis halber soll auf ein detailliertes Eingehen auf diese Verhältnisse verzichtet werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungsreihe sind in Tabelle II zusammengestellt. Der Vergleich wurde derart durchgeführt, daß eine mit der entsprechenden Sulfosäure in üblicher Weise bereitete Standardlösung, entsprechend 0,4 mg P, bei einer Standardeinstellung von 20 mm gegen die jeweils gleichzeitig mit den angeführten Zusätzen angesetzten Lösungen von gleichem P-Gehalt verglichen wurde. Die Ablesungen erfolgten in Abständen von zehn zu zehn Minuten bis zu einer Stunde. Am günstigsten erwies sich hier die 2,3,6-Sulfosäure, die auch wegen der relativen Raschheit der Farbentwicklung als Ersatz der 1,2,4-Säure in Betracht kommen könnte.

Zusammenfassung.

Die isomeren Aminonaphtholsulfosäuren und Aminonaphtholdisulfosäuren, und zwar 1,8,4-, 2,3,6- und 2,8,6-Aminonaphtholsulfosäure, und 1,8,2,4-, 1,8,3,6-, 1,8,4,6- und 2,8,3,6-Aminonaphtholdisulfosäure, wirken unter Bildung blaugefärbter Molybdänoxyde spezifisch auf den Phosphormolybdänkomplex ein. Gegenüber der von FISKE-SUBBAROW eingeführten 1,2,4-Sulfosäure zeigen sie jedoch ein wesentlich verzögertes Eintreten der maximalen Farbintensität, ein Nachteil, dem für einige eine beträchtliche Farbvertiefung entgegensteht. Eine genauere Betrachtung zeigt, daß für die Raschheit der Farbentwicklung die Stellung der SO_3H-Gruppe zur NH_2-Gruppe ausschlaggebend ist. Weniger

ausgesprochen erscheint die Abhängigkeit von der Stellung der NH_2- zur OH-Gruppe.

Gegenüber der 1,2,4-Aminonaphtholsulfosäure ergibt sich für die untersuchten Säuren, daß die Reduktion durch höhere Konzentrationen von NaCl, $NaNO_3$, $(NH_4)_2SO_4$ sowie durch die Gegenwart von Nitrit, Eisen und Oxalat deutlich gehemmt wird. Für die 1,2,4-Säure konnte gezeigt werden, daß nach dem Vorgehen von JENDRASSIK und LOHMANN Kieselsäure stört, was bei Untersuchungen an biologischem Material eventuell zu berücksichtigen ist.

Untersuchungen über proteolytische Wirkung von Hefen.

Von **Franz Zaribnicky** (Wien).

(Aus dem Institut für Milchhygiene, Lebensmittel- und Futtermittelkunde der Tierärztlichen Hochschule Wien.)

(Eingelangt am 4. Juli 1929.)

Die proteolytische Fähigkeit verschiedener Mikroben ist meist nur qualitativ durch Beobachtung von Verflüssigung auf Gelatinenährböden verfolgt worden. Es erschien jedoch wünschenswert, den Vorgang der Proteolyse quantitativ zu verfolgen, um über sein Ausmaß zahlenmäßige Anhaltspunkte zu gewinnen.

In bisher erfolgten Veröffentlichungen einschlägiger Untersuchungen durch F. Zaribnicky und F. Münchberg[1]), F. Zaribnicky und F. Weigner[2]), F. Zaribnicky und A. Staffe[3]) sind es vorwiegend Vertreter verschiedener Schizomyceten, deren proteolytische Eigenschaften untersucht wurden. Abgesehen von den notwendigen bakteriologischen Methoden kam ganz allgemein als Nährboden sterile Milch in Frage, in welcher durch das nachstehend wiedergegebene Verfahren die Eiweißabbauprodukte quantitativ ermittelt wurden. Nach Bebrüten der sterilen Milch mit dem zu prüfenden Vertreter der Saccharomyceten durch verschieden lange Zeit im Brutschranke wurde sie folgendermaßen verarbeitet:

1. 1 ccm der so vorbehandelten Milch wird in ein 10-ccm-Meßkölbchen einpipettiert.
2. Eintragen von 0,2 g kristall. Magnesiumsulfat und Auflösen.
3. Auffüllen bis zur Marke mit Methanol „Kahlbaum" [D = = 0,814].
4. Nach Verschluß des Kölbchens mit eingeriebenem Stöpsel wurde zwei bis drei Minuten der Kolbeninhalt kräftig geschüttelt, weggestellt bis zum Absetzen des Niederschlages.
5. Klare Flüssigkeit wird durch ein gehärtetes Filter (Schleicher-Schüll 575) filtriert und in einem aliquoten Teil der Stickstoffgehalt mittels Mikrokjeldahlverfahren von F. Pregl[4]) im Apparate nach der Modifikation von Parnas und Wagner[4]) bestimmt.

---

[1]) F. Zaribnicky u. F. Münchberg, Milchw. Forschgn. 1926, 3, 404—413.
[2]) F. Zaribnicky u. F. Weigner, Milchw. Forschgn. 1926, 3, 432—459.
[3]) F. Zaribnicky u. A. Staffe, Milchw. Forschgn. 1928, 55, 361—373.
[4]) F. Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse, Berlin 1923.

Allerdings zeigte sich bereits in den Vorversuchen, daß das Wachstum der Hefen in steriler Milch nur langsam vonstatten ging, so daß es sich als vorteilhaft erwies, die Hefen zuerst auf Milchzuckeragar durch längere Zeit fortzuzüchten und sie erst nach dieser Passage in Milch zu überimpfen. Das Wachstum der Hefen wurde von Zeit zu Zeit mikroskopisch kontrolliert und die Reinkultur festgestellt.

In der folgenden Tabelle sind die Versuchsergebnisse mit den Hefen wiedergegeben.

Hefen	mg N in 1 cm^3 Filtrat = 0·1 ccm Milch		
	nach 14 Tagen	nach 8 Wochen	Differenz
Weinhefe	0,0798	0,1078	0,0280
Rahmhefe	0,0798	0,1106	0,0308
Anomalushefe	0,0728	0,3262	0,2534
Zygosaccharomyces	0,1078	0,2828	0,1750
Apiculatus	0,0798	0,1806	0,1008
Endomyces	0,1078	0,2996	0,1918
Saccharomyces lactis	0,0728	0,1750	0,1022
Mycotorula	0,0798	0,3146	0,2348
Rosahefe	0,0658	0,1806	1,1148
Kontrollprobe	—	0,0574	—

Aus dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß die Fähigkeit der einzelnen Hefen in steriler Milch proteolytisch zu wirken bereits nach 14 Tagen recht verschieden hoch ist, gemessen am Stickstoffgehalt der Methanollösung. Deutlicher jedoch wird die Intensität der Proteolyse bereits nach acht Wochen, und die Differenzen zwischen den Werten nach 14 Tagen und nach acht Wochen zeigen recht auseinanderliegende Werte. Zur Kontrolle wurde auch in steriler, unbeimpfter Milch der Gehalt an methanollöslichem Stickstoff bestimmt, wobei ein Wert von 0,0574 mg in 1 ccm Filtrat, entsprechend 0,1 ccm Milch, gefunden wurde. Dieser Wert liegt innerhalb der bis jetzt in zahlreichen Versuchen ermittelten Werte für methanollöslichen Stickstoff in steriler, unbeimpfter Milch, welcher mit 0,040 mg bis 0,068 mg für 0,1 ccm Milch bestimmt wurde. Ebenso wurde der Gesamtstickstoffgehalt in 0,1 ccm keimarm gewonnener, bei 100° C fraktioniert sterilisierter Milch von 0,470 bis 0,530 mg ermittelt. Der Vollständigkeit halber sei bemerkt, daß sich auch bei Überprüfung der angeführten Hefen auf ihre pro-

teolytische Fähigkeit nicht immer schon makroskopisch ein Anhaltspunkt gewinnen ließ, durch Besichtigung der einzelnen Milchproben.

In Analogie zu den bisher an Schizomyceten durchgeführten Untersuchungen kann auch für die Hefen als Vertreter der Saccharomyceten eine in Milch als Nährsubstrat wechselnde proteolytische Fähigkeit beobachtet werden.

Die angegebene Methode der Bestimmung des methanollöslichen, stickstoffhaltigen Anteiles, nach dem Mikrokjeldahlverfahren von F. Pregl, ermöglicht eine zahlenmäßige Feststellung über die Stärke der proteolytischen Fähigkeit bei den einzelnen Hefen.

Berichtigungen:

pag. 22, erste Zeile von oben, statt: indentifiziert soll es lauten: „identifiziert";
pag. 25, im 2. Absatz, zweite Zeile von unten, statt: im Wasserauftrieb soll es lauten: „durch Wasserauftrieb";
pag. 134, im Bild 1 sollen die Bezeichnungen M_2 und M_1 lauten;
pag. 217, erste Zeile von oben, statt: siehe Seite 7 soll es lauten: „siehe Seite 209".